

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DO
COMPORTAMENTO

Patrick Remus Suman

PADRONIZAÇÃO DO NADO FORÇADO REPETIDO EM
CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Suman, Patrick Remus
PADRONIZAÇÃO DO NADO FORÇADO REPETIDO EM CAMUNDONGOS
SUÍÇOS MACHOS / Patrick Remus Suman ; orientadora, Cilene
Lino de Oliveira - Florianópolis, SC, 2016.
107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Teste do Nado Forçado Repetido. 3.
Antidepressivos . 4. Camundongos Machos. I. Lino de
Oliveira, Cilene. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Título.

Patrick Remus Suman

**PADRONIZAÇÃO DO NADO FORÇADO REPETIDO EM
CAMUNDONGOS MACHOS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia.

Orientador: Prof^ª Dr^a Cilene
Lino de Oliveira

Florianópolis

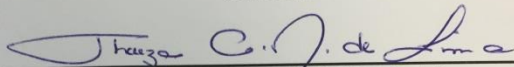
2016

"Padronização do nado forçado repetido em camundongos Suíços machos"

Por

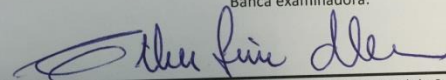
Patrick Remus Suman

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (03/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia - UFSC.

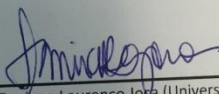


Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

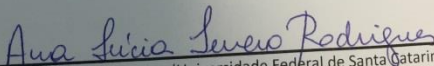
Banca examinadora:



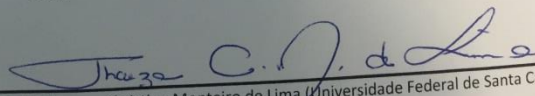
Dr(a) Cilene Lino de Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Sâmia Regiane Lourenço Jota (Universidade de São Paulo)



Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima (Universidade Federal de Santa Catarina)

*Para todos que estiveram ao meu lado ao longo desta
jornada...*

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais por me proporcionar a oportunidade (e insistência) de poder estudar e por todo o suporte ao longo da minha trajetória. Obrigado!

A prof^a Cilene, pelo direcionamento e auxílio em todas as etapas deste trabalho. Obrigado pela confiança!

Ao pessoal do Lab: Todos foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Aos amigos de longa data e aos novos que fiz nesta nova etapa aqui em Florianópolis. Todos vocês são muito importantes! Não posso deixar de citar alguns em especial. André e Giseli Colla, Jonas, Dani, Guilherme, Lucas e Marcos e a todos os outros um muito obrigado!

Aos deuses do Rock n'Roll que embalam essas análises *“if god loves rock 'n' roll, i'd better reset my goal do everything i can to be a rocking man” (Andi Deris)*

Em especial para Priscila, que mais do que nunca, esteve do meu lado com todo o carinho e atenção do mundo! Te amo!

As agências de financiamento CAPES e CNPq.

“Born to lose, Live to win!”

Lemmy Kilmister

RESUMO

Buscando diminuir o número de animais utilizados em pesquisa, surge a necessidade de novos testes para predição de efeitos farmacológicos bem como o refinamento e atualização dos testes já existentes. O teste do nado forçado proposto por Porsolt é um modelo animal utilizado para detecção de efeitos antidepressivos em roedores e tem sofrido mudanças no seu protocolo desde a sua criação. O teste do nado forçado repetido (TNF-r) em camundongos é uma das modificações do teste de Porsolt. O TNF-r consiste em submeter os camundongos a uma sessão de nado forçado de 6 minutos (teste) que é repetida aos 7 (reteste 1) e 14 (reteste 2) dias após o teste. Neste trabalho buscamos avaliar os comportamentos dos animais e como reagem as sessões do TNF-r. O Grupo controle mostrou que a repetição por si só aumenta o tempo de imobilidade e que logo no primeiro minuto do reteste 2 já chega quase no teto. Buscando então a menor dose efetiva usamos as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg de Fluoxetina (FLX), Bupropiona (BUP), Desipramina (DESI) e Butirato de sódio (BS). Interessantemente nenhuma das drogas em nenhuma das doses foi efetiva para reduzir o tempo de imobilidade na sessão teste e nem a repetição com a administração crônica reverteu este quadro. Por fim buscaremos entender o comportamento animal e quais os possíveis motivos desta falta de efetividade para estes animais no teste.

Palavras chave: Antidepressivos, camundongos machos, teste do nado forçado repetido.

ABSTRACT

Reduction in the number of animals used in biomedical research is an ethical requirement for the current stage of this science. The updating of existing animal models may contribute to creation of new animal tests with more validity. The forced swimming test (FST) proposed by Porsolt is an animal model used to detect effects of acute treatment with antidepressants in rodents. FST has undergone changes in its protocol since it was proposed. The repeated FST (r-FST) is one Porsolt test modification validated for rats. The aim in this work is to standardize r-FST for Swiss mice. The protocol of r-FST for Swiss mice consisted in subjecting the mice to a forced swim session of 6 minutes (test) that was repeated at 7 (retest 1) and 14 (retest 2) days after the test. As observed in male rats, untreated male Swiss mice respond with increased immobility to the repetition of forced swimming. To investigate the effects of antidepressants on immobility of Swiss mice in r-FST, mice received oral treatment with fluoxetine (FLX), bupropion (BUP), desipramine (DESI) and sodium butyrate (BS) in the doses of 1, 3, 10 and 30 mg/kg. Interestingly, none of the drugs in any dose reduced the immobility time in the test session as expected according to the literature. In addition, the chronic administration with antidepressants also failed to reduce immobility. When T-test was used to compare experimental group to the control group, BUP (10 mg/kg) reduced immobility significantly in the test and BS (10 mg/kg) did it in the retest 1. When mice were split into low immobility (LI) and high immobility (HI) categories, the anti-immobility effects of BUP (10 mg/kg) and BS (10 mg/kg) appeared in the test of LI groups. Discussion brings bibliography to understand why Swiss mice were more resistant to antidepressant treatment than anticipated by the current literature. Together data indicate that, in our conditions, Swiss mice may represent a new model to detect antidepressants with atypical mechanisms of action in the FST.

Keywords: Repeated forced swimming test, Antidepressants, male mice.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema do desenho experimental do TNF-repetido para camundongos.....	40
Figura 2:Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total na sessão teste (n=9).	50
Figura 3: Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total na sessão reteste 1 (n=9).	51
Figura 4: Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total na sessão reteste 2 (n=9).	52
Figura 5: Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total comparando imobilidade e nado em todas as sessões do TNF-repetido (n=9).....	53
Figura 6: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 1mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões de teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M.....	57
Figura 7: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 1mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M.....	58
Figura 8: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 1mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M.....	59
Figura 9: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 3mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M.....	61
Figura 10: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 3mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M.....	62
Figura 11: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 3mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas	

sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M	63
Figura 12: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 10mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M	64
Figura 13: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 10mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M	65
Figura 14: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 10mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M	66
Figura 15: Diminuição da imobilidade do grupo BUP 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão teste nos 6 minutos totais $p < 0,05$ (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M. * = Significativamente diferente em relação ao controle. Teste T = $p = 0,02$	67
Figura 16: Aumento do nado no grupo BUP 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão teste nos 6 minutos totais $p < 0,05$ (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M. * = Significativamente diferente em relação ao controle. Teste T = $p = 0,02$	67
Figura 17: Diminuição da imobilidade do grupo BS 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão reteste 1 nos 6 minutos totais $p < 0,05$ (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M. * = Significante diferente em relação ao controle. Teste T = $p = 0,04$	68
Figura 18: Aumento do nado no grupo BS 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão reteste 1 nos 6 minutos totais $p < 0,05$ (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M. * = Significante diferente em relação ao controle. Teste T = $p = 0,04$	68
Figura 19: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 30mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M	70

Figura 20: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 30mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, TNF-r nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M.....	71
Figura 21: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 30mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M.....	72
Figura 22: Tempos de imobilidade, nado e escalada do grupo FLX 20mg administrados por via IP. GA = FLX 20mg. GB = Controle Salina 0,9% (n=7 e 8 respectivamente).....	74
Figura 23: Tempos de imobilidade, nado e escalada do grupo FLX 20mg administrados por via oral. GC = FLX 20mg GD = Controle sacarose 10% (n=8 e 7 respectivamente).	75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Fármacos e respectivas doses utilizadas nos experimentos.	40
Tabela 2: Experimentos, grupos experimentais e tratamento.	41
Tabela 3: Latência, Frequência e Duração das categorias imobilidade, nado e escalada do grupo Controle Total nas sessões do TNF-r.	48
Tabela 4: Tempo de imobilidade dos grupos controle no teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r.	55
Tabela 5: Revisão sistemática utilizando as palavras chave mice AND forced swimming test AND fluoxetine.	77
Tabela 6: Revisão sistemática utilizando as palavras chave mice AND forced swimming test AND bupropione.	78
Tabela 7: Revisão sistemática utilizando as palavras chave mice AND forced swimming test AND desipramine.	79
Tabela 8: Redução de imobilidade em relação ao grupo controle em relação aos dados obtidos da revisão sistemática.	80
Tabela 9: Tempo de imobilidade dos animais nos grupos LI e HI na sessão teste do TNF-r: número e porcentagem de animais em cada sub grupo.	89
Tabela 10: Tempo de imobilidade dos animais nos grupos LI e HI na sessão reteste 1 do TNF-r número e porcentagem de animais em cada sub grupo.	90
Tabela 11: Tempo de imobilidade dos animais nos grupos LI e HI na sessão reteste 2 do TNF-r número e porcentagem de animais em cada sub grupo.	91

Lista de abreviaturas

TNF-r – Teste do nado forçado repetido

FLX – Fluoxetina

BUP – Bupropiona

BS – Butirato de sódio

DESI – Desipramina

5 – HT - Serotonina

I.P – Intraperitoneal

5 – HT2B – Receptor de serotonina

HI – alta imobilidade

LI – baixa imobilidade

ADM – Administração

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 A Neurobiologia da depressão e dos antidepressivos.....	27
1.2 Modelos animais de depressão e validades dos modelos	30
1.3. Teste do nado forçado e suas variações	32
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral:.....	35
2.2 Objetivos Específicos primários:	35
2.3. Objetivos Específicos secundários:	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Estratégia experimental:	37
3.2 Sujeitos experimentais:.....	38
3.3 Condições de alojamento:.....	38
3.4. Desenho experimental e grupos experimentais:	39
3.5 Procedimentos do TNFr	41
3.6 Descrição e análise dos comportamentos	42
3.7 Eutanásia:	43
3.8 Revisão sistemática no Pubmed:	43
3.8.1 Critérios de inclusão:	43
3.8.2 Critérios de Exclusão:.....	43
4. CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5. RESULTADOS	47
5.1 Análise Qualitativa dos comportamentos dos animais do grupo Controle Total no TNF-r. Uma descrição dos comportamentos de animais naïve.	47
5.2 Análise quantitativa: Efeitos do tratamento com os antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.....	55

5.2.1. Experimento 1: Efeitos do tratamento com 1mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.	55
5.2.2. Experimento 2: Efeitos do tratamento com 3 mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.	56
5.2.3. Experimento 3: Efeitos do tratamento com 10 mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.	60
5.2.4. Experimento 4: Efeitos do tratamento com 30 mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.	69
5.2.5. Experimento 6: Seleção de uma dose de fluoxetina efetiva no TNF a partir da literatura e a comparação dos efeitos do tratamento com 20 mg/kg de fluoxetina administrada por gavagem ou intraperitoneal sobre os comportamentos na sessão teste de Porsolt.	73
5.3. Revisão sistemática e a frequência de resultados negativos encontrados na literatura.	76
5.3.1 Palavras chave: mice AND forced swimming test AND fluoxetine.	76
5.3.2 Palavras chave: mice AND forced swimming test AND bupropion	77
5.3.3 Palavras chave: mice AND forced swimming test AND desipramine	78
5.3.4 Palavras chave: mice AND forced swimming test AND sodium butyrate	79
5.3.5. Comparação entre os dados do presente estudo com os dados da literatura	80
6. DISCUSSÃO.....	81
6.1 O TNF-r e o camundongo suíço macho.	81

6.2. Resposta comportamental dos camundongos suíços machos no TNF-r a administração aguda e crônica dos antidepressivos. .	82
6.3. Ausência dos efeitos esperados dos antidepressivos no teste de Porsolt: possíveis fontes de erro ou de variação experimental: ...	85
6.4 O teste do nado forçado repetido em camundongos suíços machos: muitos resultados negativos, poucos resultados positivos e uma revisão da literatura.....	92
6.5 Problemas, soluções e futuros direcionamentos	93
7. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Neurobiologia da depressão e dos antidepressivos

A depressão hoje é uma das principais causas de problemas de saúde e um grande problema para a economia mundial e tendo isto em vista a necessidade de desenvolver terapias eficazes e eficientes continua grande. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a depressão tornou-se a segunda causa mais comum de deficiência induzida por doença no mundo (Levinstein e Samuels, 2014; Belzung *et al.*, 2015; Willner e Belzung, 2015). Os transtornos de humor estão entre as formas mais comuns de doença mental e estima-se que as formas graves da doença afetem cerca de 2% a 5% da população dos EUA, e até 20 % da população sofrem de formas mais leves da doença (Nestler *et al.*, 2002). Mais comum em mulheres, a depressão é mais prevalente do que em homens, e é caracterizada pela presença de perda de prazer ou interesse em atividades normalmente prazerosas, conhecida por anedonia juntamente com uma série de outras características, incluindo alterações do sono e do apetite, tristeza, e ideação suicida (Nestler *et al.*, 2002; Willner *et al.*, 2013).

A 'hipótese das monoaminas' continua como mais aceita e propõe que a depressão é causada por uma diminuição da função das neurotransmissão monoaminérgica no cérebro. Dentre as primeira evidências indicativas do papel das monoaminas na gênese da depressão está o fato que, fármacos como o antigo antihipertensivo a reserpina, depleta os níveis de monoaminas e causa sintomas depressivos nos pacientes. Além disso, inibidores da monoamina oxidase (iMAO) e da recaptação de monoaminas (como a imipramina) preveniam ou revertiam a sedação induzida por reserpina em animais (Achor *et al.*, 1955; Schildkraut, 1965). Sulser *et al.* (1964) observaram que a reversão dos efeitos da reserpina por drogas como a imipramina dependia da disponibilidade e quantidade de catecolaminas e que em animais que tinham os estoques de catecolaminas depletados, a imipramina não tinha efeito. O antagonismo dos efeitos da reserpina pelos iMAO parece também depender do aumento dos níveis de norepinefrina (Schildkraut, 1965; Schildkraut e Kety, 1967). Estudos posteriores também mostraram que a melhora na transmissão da serotonina e noradrenalina central, com o uso da imipramina, gerava efeitos antidepressivos nos

pacientes (Krishnan e Nestler, 2008). As duas últimas décadas foram de um progresso notável na compreensão da natureza das anomalias e de informação e processamento que caracterizam a depressão, quais são as mudanças na atividade de rede neural que acompanham essas mudanças e quais as relações entre a psicopatologia e a fisiopatologia da depressão (Willner e Belzung, 2015).

Estudos epidemiológicos mostram que 40% a 50% do risco de depressão é genético (Fava e Kendler, 2000; Nestler *et al.*, 2002; Willner *et al.*, 2013). Além disso, existem as mudanças epigenéticas que oferecem um mecanismo pelo qual as experiências ambientais podem modificar a função do gene na ausência de alteração da sequência de DNA, e podem ajudar a explicar estudos de associação genética em grande parte inconsistentes de depressão minando, por exemplo, o impacto da transcrição de polimorfismos de sequência de DNA devido a modificações epigenéticas sobre aqueles genes promotores (Nestler, 2002; Krishnan e Nestler, 2008). Modificações pós-traducionais de resíduos de aminoácidos nas caudas de histona, podem ser um possível mecanismo de regulação epigenética, alterando a conformação estrutural da cromatina e, assim, controlando o acesso ao DNA pela maquinaria transcricional fazendo parte da adaptação do indivíduo ao estresse crônico (Ferland e Schrader, 2011; Sales e Joca, 2016). A teoria neurogênica é outra possibilidade mecanicisticamente plausível (Miller e Hen, 2015). De acordo com esta teoria, a quantidade de neurônios novos que são fisiologicamente adicionados ao giro dentado do hipocampo, que é um regulador chave do humor e ansiedade, estaria diminuída nos transtornos de humor (Kheirbek *et al.*, 2012; Miller e Hen, 2015). Além disso, neurônios do hipocampo são necessários para a separação eficiente de padrões e flexibilidade cognitiva em roedores, a função cognitiva que pode ser prejudicada nos pacientes com depressão (Miller e Hen, 2015). A teoria neurogênica, por sua vez, pode ajudar a subcategorizar esses transtornos e a orientar o tratamento o que de fato é interessante, porque a fisiopatologia da depressão e dos transtornos do humor ainda é mal elucidada e não compreendida em virtude de sua complexidade, e a teoria pode levar a tratamentos que podem ser direcionados a neurogênese (Miller e Hen, 2015).

Atualmente o diagnóstico de transtornos psiquiátricos depende principalmente de uma entrevista psiquiátrica e de avaliação com base em diretrizes internacionais, por isso a tentativa de desenvolvimento de biomarcadores genômicos e perfis de proteína do soro são candidatos para biomarcadores em psiquiatria e constituem uma área de interesse crescente, podendo vir a ter considerável potencial

futuro (Kalia e Costa, 2015). O diagnóstico é importante para a escolha do tratamento mais adequado para cada paciente.

Para o tratamento da depressão a maioria dos fármacos antidepressivos atualmente disponíveis atuam modificando a neurotransmissão mediada pelas monoaminas (noradrenalina; dopamina; serotonina) no cérebro, como foi estabelecido a partir de investigações aprofundadas que se seguiram a descoberta empírica destas drogas (Hamon e Bourgoïn, 2006). Dentre as evidências mais convincentes disto, está a observação que a melhora do humor promovida pelos antidepressivos poderia ser prejudicada pela inibição da síntese de 5 – HT, que poderia ser causada pela ingestão de uma dieta pobre de triptofano, mesmo naqueles pacientes que já haviam respondido de forma positiva ao tratamento com várias classes de drogas antidepressivas (Delgado *et al.*, 1990). Apesar de úteis para o tratamento da depressão, dos transtornos de ansiedade e outros transtornos psiquiátricos, os fármacos antidepressivos baseados em mecanismos monoaminérgicos possuem várias limitações (Whiskey e Taylor, 2013; Crawford *et al.*, 2014). Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), apesar de melhor tolerados do que os antidepressivos tricíclicos por exemplo, apresentam efeitos colaterais tais como, insônia, dor de cabeça, ansiedade e disfunção sexual (Goldstein e Goodnick, 1998; Crawford *et al.*, 2014). Os inibidores de recaptação de noradrenalina por sua vez, apresentam efeitos cardiovasculares, além de disfunção sexual e insonia e suor em excesso (Whiskey e Taylor, 2013). Além de efeitos colaterais, o tratamento com os fármacos antidepressivos possui uma latência longa para o início dos efeitos terapêuticos o que por muitas vezes leva ao abandono do tratamento (Whiskey e Taylor, 2013; Crawford *et al.*, 2014; Willner *et al.*, 2014).

O fato é que depois de meio século de intensa investigação, desde a introdução dos medicamentos antidepressivos na prática clínica, a sua eficácia ainda permanece baixa, (algo em torno de 70 %) e o início da ação permanece lento, (em torno de 4-6 semanas) e com poucas exceções, as drogas recentemente introduzidas na prática clínica são apenas variantes de medicamentos já existentes. Em outras palavras, não houve quase nenhum progresso para a identificação de novos alvos para melhorar esses parâmetros clínicos e chegarem a clínica de forma eficaz. (Hamon e Bourgoïn, 2006; Willner e Belzung, 2015). O futuro para o desenvolvimento de novos compostos desta classe de medicamentos, capazes de atuar nos novos alvos terapêuticos, tem por objetivo reduzir efeitos colaterais e agilizar a eficácia para o tratamento. Assim, a

contribuição de novos alvos terapêuticos como os mecanismos epigenéticos e a neurogênese hipocampal tem sido estudados em modelos animais (Schroeder *et al.*, 2007; Covington *et al.*, 2009; Reul, 2014; Miller e Hen, 2015; Sales e Joca, 2016). Por exemplo, os Inibidores da enzima histona deacetilase (HDAC) administrados em camundongos por via IP reduziram os efeitos do estresse e quando administrados diretamente no núcleo accumbens promoveram a regulação da expressão gênica podendo ser uma potencial classe de antidepressivos futuramente (Russo e Charney, 2013). O tratamento crônico com antidepressivos parece facilitar a incorporação de neurônios novos a circuitaria hipocampal e quando esta incorporação é prejudicada alguns dos efeitos comportamentais dos antidepressivos em camundongos desaparecem (Santarelli *et al.*, 2003). Recentemente a descoberta de uma nova classe de antidepressivos sugere o envolvimento do sistema glutamatérgico nos mecanismos de ação dos antidepressivos e do anestésico cetamina, um antagonista de receptor NMDA que demonstra efeitos antidepressivos rápidos e melhora os sintomas, bem como reduz ideações suicidas em pacientes que fazem uso deste fármaco (Scheuing *et al.*, 2015). Para testar todas essas hipóteses, possíveis candidatos a alvos e biomarcadores além de possíveis novos tratamentos são necessários os modelos animais, os quais contribuem fortemente para compreendermos as causas e os efeitos em organismos vivos que podem simular o potencial benefício, o ser humano.

1.2 Modelos animais de depressão e validades dos modelos

Vários dos modelos que avaliam respostas ao estresse mostram validade farmacológica, ou seja, eles são sensíveis para antidepressivos conhecidos e compostos administrados de forma aguda permitindo a avaliação rápida dos novos agentes com potencial terapêutico. As validades são divididas em pelo menos três categorias: preditiva, de face (de analogia) e constructo (ou homologia) (Powell *et al.*, 2012). Segundo Willner (1984) a validade preditiva é alcançada caso um modelo identifique corretamente tratamentos antidepressivos de diversos tipos, sem cometer erros e se a potência da droga no modelo se correlaciona com a potência clínica. A validade de face para um modelo animal de depressão, por exemplo, representa a analogia entre o modelo e a doença, ou seja, se o modelo apresenta “sintomas” que se assemelham a depressão em vários aspectos. A validade de construto de

um teste é mais comumente definida como a precisão com que o teste mede aquilo que se pretende medir, ou seja, a capacidade do modelo de recriar no animal os processos etiológicos causados pela doença, no entanto, essa definição varia constantemente e pode ser interpretada de outras formas (Willner, 1984; Powell *et al.*, 2012).

Os modelos animais são desenvolvidos para fins específicos experimentais que podem contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos (Willner, 1990). O objetivo principal do desenvolvimento destes modelos foi elucidar processos psicológicos, que agora são usados em grande parte para tratar de questões neurobiológicas, incluindo os mecanismos de ação de drogas psicoterapêuticas assim como os neurotransmissores e neurorreceptores envolvidos, as mudanças intracelulares subjacentes, os estados psiquiátricos, a base neuroanatômica dos estados psiquiátricos, e cada vez mais, questões sobre o papel de genes específicos; e, naturalmente, a avaliação do valor psicoterapêutico potencial de intervenções farmacológicas e não farmacológicas novas. (Willner e Belzung, 2015).

Em depressão os modelos animais são avaliados quanto à sua validade etiológica. Para serem válidos, os comportamentos dos animais precisam ser causados ou desencadeados pelas mesmas etiologias que desencadeiam a depressão humana. Esta é uma exigência desafiadora, dada a ausência de etiologias definitivas para a depressão humana em animais e por não podermos saber se o animal, de fato, está realmente deprimido, lembrando que o animal seja ele rato ou camundongo não é um ser humano (Nestler *et al.*, 2002; Cryan e Holmes, 2005; Krishnan e Nestler, 2008; Levinstein e Samuels, 2014).

O estresse parece ser desencadeador de depressão e outros transtornos psiquiátricos em humanos (Russo e Charney, 2013) assim, alguns dos modelos atuais avaliam as respostas de um animal a este estresse inevitável seja ele, agudo ou crônico (Willner, 1990; Petit-Demouliere *et al.*, 2005; Colla *et al.*, 2012; Belzung, 2014; Manosso *et al.*, 2016) Dentre estes modelos se inclui o teste do nado forçado, que quantifica a imobilidade (proposto para ser análogo ao “desespero comportamental” observado em depressão) (Porsolt, Bertin, *et al.*, 1977; Porsolt *et al.*, 1978; Detke *et al.*, 1995; Mezdri *et al.*, 2011). Outros ensaios incluem medir a interação social (que pode modelar o afastamento social de condições de depressão, (Wilson e Koenig, 2014), o teste de desamparo aprendido (do inglês learned helplessness o qual mede o desenvolvimento de respostas passivas frente ao choque inevitável nas patas (Willner, 1990), e a auto-estimulação intracraniana (uma medida operante do esforço que um animal gasta para estimular

circuitos de recompensa do cérebro eletricamente (Negus e Miller, 2014). Os modelos que utilizam um estresse agudo (por exemplo, nado forçado) podem ser considerados como 'testes' de comportamento de enfrentamento da situação estressante, e são limitados em sua capacidade de recapitular uma síndrome multidimensional de longa duração, como a depressão.

1.3. Teste do nado forçado e suas variações

O teste do nado forçado ou teste de 'desespero comportamental' é um teste comportamental para uso em ratos ou camundongos, que prediz a possível atividade antidepressiva de substâncias em humanos e tem sido amplamente utilizado em pesquisa básica e na descoberta de novos farmacos antidepressivos (Gavioli *et al.*, 2004; Slattery e Cryan, 2012; Bettio *et al.*, 2014; Poleszak *et al.*, 2015). É também um dos testes mais comumente utilizados para avaliar o grau de inibição comportamental ou o “comportamento depressivo” de animais experimentais (Lucki *et al.*, 1994; Lino-De-Oliveira *et al.*, 2005; Bogdanova *et al.*, 2013). Alguns autores também propõem sua utilização como teste de memória de eventos aversivos (Molendijk e De Kloet, 2015)

Originalmente proposto por Porsolt (Porsolt, Bertin, *et al.*, 1977; Porsolt, Le Pichon, *et al.*, 1977; Porsolt *et al.*, 1978) consiste basicamente na exposição do animal a um pequeno cilindro com água suficiente para o animal nadar sem apoiar as patas no fundo. O teste de Porsolt em ratos consiste em duas sessões de nado forçado separadas por 24 h (pré-teste e teste). Durante o período de teste (5 min) é medido o tempo que o animal gasta na postura de imobilidade, que é o indicador da aquisição do “desespero comportamental” durante o período de 15 min de pré-teste (Porsolt, Bertin, *et al.*, 1977; Porsolt, Le Pichon, *et al.*, 1977; Porsolt *et al.*, 1978). A mesma observação encontrada em ratos também foi encontrada em camundongos que após administrações com antidepressivos também apresentavam redução do tempo de imobilidade (Powell *et al.*, 2012). No entanto ratos e camundongos reagem diferentemente ao teste de Porsolt e por isso seus protocolos também devem ter diferenças (Borsini, 1995). O teste de Porsolt em camundongos não requer o pré-teste de 15 minutos (David *et al.*, 2001) e o tempo de duração do teste é de 6 minutos. Devido a baixa imobilidade nos dois minutos iniciais do teste apenas os 4 minutos finais são

contados e analisados no protocolo de Porsolt (Petit-Demouliere *et al.*, 2005).

Algumas alterações no teste de Porsolt já foram efetuadas a fim de torná-lo mais eficaz e sensível. Para ratos foram propostas e validadas algumas alterações como, por exemplo, aumentar a profundidade da água (impedindo até mesmo que a cauda se apoie ao fundo) e o registro de amostras dos comportamentos ativos (nadar ou escalar) ou passivos (imobilidade) a cada 5 s durante o período do teste. (Detke *et al.*, 1995; Cryan *et al.*, 2005). Para camundongos, não houve muitas propostas de mudanças nos procedimentos do teste de Porsolt que tenham sido validadas. Costa *et al.*, 2013 propuseram uma modificação processual simples, no teste de Porsolt em camundongos suíços, como a análise minuto a minuto melhorou a previsibilidade do teste de evitar resultados falsos positivos com estimulantes da atividade motora, além de propor uma análise dos dois minutos iniciais. Apesar da escassa validação das variações do teste de Porsolt para camundongos, se pode encontrar uma variedade de protocolos na literatura inclusive com a utilização do protocolo de ratos para camundongos (Pandey *et al.*, 2008; Pawar *et al.*, 2009). A validação de um protocolo é importante, pois existem muitos aspectos dos procedimentos que podem afetar o resultado dos experimentos. Em camundongos já foi verificado que a idade do animal pode ser um fator que pode mascarar resultados assim como a linhagem e o número de administrações da substância a ser testada (Bourin *et al.*, 1992; Bourin *et al.*, 1996; Bourin *et al.*, 1998; Dalvi e Lucki, 1999; Dulawa *et al.*, 2004). A padronização de testes comportamentais para camundongos é importante porque ferramentas úteis para o entendimento das doenças e a busca para novos alvos farmacológicos como por exemplo “knockouts” são mais frequentemente desenvolvidos nestas espécies do que em ratos (Gardier e Bourin, 2001).

Em ratos foi desenvolvido um protocolo de teste de Porsolt repetido (TNF-r,) (Mezadri *et al.*, 2011) que detectou o aumento gradual da eficácia de doses baixas de Fluoxetina ao longo do tempo e parece ser adequado para detectar efeitos de curto e longo prazo de inibidores da recaptação da serotonina ou outros antidepressivos em doses menores que as eficazes no TNF (Possamai *et al.*, 2015). Além disso, o TNF-r necessita de uma quantidade de animais 3 vezes menor para a avaliação dos efeitos agudos e crônicos dos tratamentos uma vez que é possível usar o mesmo animal para obtenção de efeitos tanto agudos quanto crônicos (Mezadri *et al.*, 2011; Possamai *et al.*, 2015). Como parte da validação do TNF-r também já foi demonstrado que o ambiente é fator

de atenção e pode criar um viés quando os animais são inseridos em ambiente enriquecidos (Silva *et al.*, 2011; Possamai *et al.*, 2015).

Em camundongos, o TNF-r não foi ainda padronizado ou validado e com este intuito procuramos entender como o camundongo suíço se comporta no teste e suas sessões de repetição bem como a eficácia na predição de efeitos farmacológicos com esta alteração do modelo clássico. Escolhemos o camundongo suíço porque segundo Bourin *et al.* (2005) o camundongo suíço no FST é a primeira escolha, pois a maioria das drogas testadas nesta linhagem são eficazes se compararmos a outras linhagens. Nossa hipótese é que partindo do princípio do TNF-r em ratos, doses de antidepressivos menores que aquelas efetivas no TNF tradicional serão efetivas no TNF-r após o tratamento crônico em camundongos suíços machos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral: Desenvolver, padronizar e validar os protocolos de TNF-r em camundongos suíços machos.

2.2 Objetivos Específicos primários:

- Estabelecer o protocolo experimental para o TNF-r em camundongos Suíços machos. Determinar o catálogo comportamental no teste, reteste 1 e reteste 2.
- Avaliar a capacidade de predição de efeito antidepressivo de fármacos com diferentes mecanismos de ação no TNF-r em camundongos Suíços machos.
- Avaliar se um composto com potencial atividade antidepressiva seria eficaz em reduzir a imobilidade dos camundongos Suíços no TNF-r.
- Determinar a menor dose efetiva para cada composto testado no TNF-r.

2.3. Objetivos Específicos secundários:

- Avaliar se a via de administração utilizada poderia interferir no efeito dos fármacos no teste de Porsolt em camundongos suíços machos.
- Fazer uma revisão sistemática para estimar com que frequência ocorre na literatura o relato de um resultado negativo, i.e., ineficácia de antidepressivos testados em camundongos Suíços machos, adultos, tratados com antidepressivos por via oral antes do teste de Porsolt.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégia experimental:

De acordo com Mezadri *et al.* (2011) o TNF-r pode ser aplicável como um teste preditivo em testes pré-clínicos. A estratégia usada para desenvolver o TNF-r em ratos consistiu em realizar o protocolo do teste de Porsolt (pré-teste seguido de teste 24 h depois, Porsolt *et al.*, 1977) acrescentando duas sessões extras de teste aos 7 dias e 14 dias após o pré-teste (Mezadri *et al.*, 2011). As repetições do teste foram chamadas de reteste 1 e reteste 2, respectivamente. Neste trabalho aplicamos o mesmo racional para atingir o objetivo de validar tal método e definir o catalogo experimental para camundongos machos. Assim, os camundongos foram submetidos a uma sessão de nado forçado de 6 minutos (teste), de acordo com Porsolt *et al.*, 1978, seguida de uma sessão de 6 minutos 7 dias depois (reteste1), e outra 14 dias depois do teste (reteste 2) (ver Figura 1). Em camundongos o teste de Porsolt “tradicional” não requer a sessão pré-teste para detecção de efeitos agudos do tratamento (David *et al.*, 2001). Os experimentos seguiram os seguintes cronogramas: (dia 0) chegada dos animais (pós-desmame, 21 dias) ao laboratório e ambientação ao biotério onde permaneceram até a idade estabelecida para a experimentação, teste (dia 71) re-teste 1 (dia 79) re-teste 2 (dia 87) e eutanásia. Foi feito um grupo de camundongos controle não-tratado para observar o comportamento natural destes animais na situação do TNF-repetido.

Nos experimentos farmacológicos, as administrações dos fármacos e substâncias foram por via oral (0,5ml/animal gavagem). A solução veículo para todos os fármacos foi de sacarose 10% que se mostrou adequada para o tratamento de ratos machos e fêmeas (Domingues, 2015). Selecionamos como fármacos antidepressivos a fluoxetina (FLX) (inibidor seletivo da recaptação de serotonina), a desipramina (DESI) (inibidor preferencial da recaptação de noradrenalina) e bupropiona (BUP) (inibidor seletivo da recaptação de dopamina). A fluoxetina e a desipramina já foram previamente testadas em nosso laboratório e se mostraram eficazes no teste de Porsolt na dose de 30 mg/kg (Costa *et al.*, 2013). Para avaliar uma droga com potencial atividade antidepressiva escolhemos o butirato de sódio (BS) (um

inibidor da histona deacetilase) que se mostrou eficaz em reduzir a imobilidade de ratos que passaram por um protocolo de estresse de restrição no TNF (Han *et al.*, 2014). Para facilitar a comparação com a literatura, os parâmetros de frequência e duração das categorias comportamentais registradas nos testes e retestes foram totalizados em blocos de 6 minutos totais, ou dos 2 minutos iniciais ou dos 4 minutos finais, de acordo com o trabalho de Costa *et al* (2013).

Após a análise dos dados, tendo sido constatado um grande número de resultados que contrariaram a hipótese inicial, foi ainda realizado um experimento comparando os efeitos do tratamento da FLX administrada por gavagem ou por via intraperitoneal no teste de Porsolt para avaliar o papel da via de administração no efeito (ou ausência de) do fármaco. Além disso, foi também realizada uma revisão bibliográfica sistemática para estimar a frequência com que ocorre na literatura o relato de um resultado negativo, i.e., ineficácia de antidepressivos testados em camundongos Suíços machos, adultos, tratados com antidepressivos por via oral antes do teste de Porsolt. Ausência da publicação de resultados negativos pode ser evidência de viés de publicação que reduz a reprodutibilidade dos experimentos (Ter Riet *et al.*, 2012; Sena *et al.*, 2014).

3.2 Sujeitos experimentais:

Camundongos Suíços machos (n=9/grupo CT e n=8/grupo para os demais) com 90 dias. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram cautelosamente executados com o objetivo de minimizar o incômodo e o número de animais utilizados. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para experimentação animal da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC) (PP00593, Ofício nº 56/CEUA/PRPE/2012, Ver anexo). Três animais morreram antes do início do experimento por causas desconhecidas.

3.3 Condições de alojamento:

Todos os animais foram mantidos em área climatizada com temperatura de 21 ± 2 graus Celsius, exaustão e acesso água e comida *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12 h (luzes apagadas 6:00 h e ligadas às 18:00 h). Os animais foram divididos em grupos de 8 animais nas caixas-padrão (gaiolas plásticas, 50 x 30 x 10 cm cobertas com piso

coberto de serragem). Os animais permaneceram nestes ambientes pelos 60 dias anteriores ao início do teste e permaneceram neste ambiente enquanto durou o experimento comportamental. A troca das caixas era realizada a cada 3 dias, em decorrência da menor frequência de briga entre animais observado pelo experimentador.

3.4. Desenho experimental e grupos experimentais:

Para a realização do presente estudo os animais foram divididos em suas caixas aleatoriamente, onde um animal qualquer foi pego e de forma aleatória era adicionado em uma caixa-viveiro padrão pelo experimentador onde permaneceriam em grupos de 8 animais para posterior identificação como grupo tratado ou grupo controle. A divisão por tratamento, também foi de forma aleatória por meio de sorteio, onde primeiramente o tratamento era numerado e sorteado e, posteriormente cada caixa era numerada e sorteada para definirmos o tratamento que aquele grupo passaria, de acordo com o sorteio inicial do tratamento. Com o objetivo de validar o TNF- α e determinar o efeitos das doses de 0 (controle, CT e CTRL), 1, 3, 10 e 30 mg/kg/ml de cada um dos compostos antidepressivos (Tabela 1). O grupo CTRL recebeu veículo (Sacarose 10%) e cada dose possuía o seu grupo controle. O grupo controle total (CT) não recebeu nenhuma administração. Cada caixa com 8 animais recebeu um tipo de tratamento. Em cada experimento havia um grupo CTRL e uma dose de cada um dos fármacos (Tabela 2). Cada experimento foi dividido em 4 mini experimentos contendo 2 animais de cada tratamento. A via de administração foi a oral por gavagem e todas as drogas foram diluídas em sacarose 10%, protocolo estabelecido pelo laboratório para ratos machos (Domingues, 2015). Quando o fármaco foi injetado por via intraperitoneal o veículo foi a solução salina (0,9%).

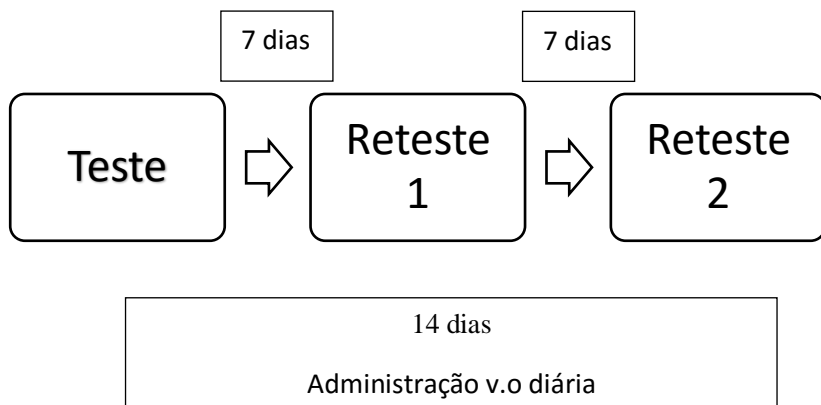


Figura 1: Esquema do desenho experimental do TNF-repetido para camundongos

Tabela 1: Fármacos e respectivas doses utilizadas nos experimentos.

Grupo (n)	Doses	Classe
Fluoxetina (FLX, Sigma, F3518) (8/grupo)	1, 3, 10 e 30 mg/kg/ml	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
Desipramina (DESI, Santa Cruz, SC200158A) (8/grupo)	1, 3 e 10 mg/kg/ml	Inibidor preferencial da recaptação de noradrenalina
Bupropiona (BUP, Eurofarma) (8/grupo).	1, 3, 10 e 30 mg/kg/ml	Inibidor não seletivo da recaptação de noradrenalina e dopamina
Butirato de Sódio (BS, Sigma, B5887) (8/grupo)	1, 3, 10 e 30 mg/kg/ml	Inibidor da histona deacetilase

Tabela 2: Experimentos, grupos experimentais e tratamento.

Experimento	Grupos (N=8-9/grupo)	Tratamento/Dose/Via/Frequencia
1	CTRL não tratado (CT)	Sem tratamento
2	CTRL, Tratado	Veiculo, FLX, DESI, BUP, BS, 1 mg/kg, gavagem, diária por 14 dias
3	CTRL, Tratado	Veiculo, FLX, DESI, BUP, BS, 3 mg/kg, gavagem, diária por 14 dias
4	CTRL, Tratado	Veiculo, FLX, DESI, BUP, BS, 10 mg/kg, gavagem, diária por 14 dias
5	CTRL, Tratado	Veiculo, FLX, BUP, BS, 30 mg/kg, gavagem, diária por 14 dias
6	CTRL gavagem ou IP, Tratado gavagem ou IP,	Veículo gavagem ou IP, Fluoxetina gavagem ou IP, 20 mg/kg, uma administração antes do teste, do reteste 1 e do reteste 2.

BUP=Bupropiona, BS= Butirato de Sódio, CTRL= Controle, DESI= Desipramina, FLX= Fluoxetina, IP= intraperitoneal.

3.5 Procedimentos do TNFr

O TNF-r em camundongos consiste da inserção do animal a um recipiente (24cm altura x 14 cm de diâmetro) com água, onde o animal permanece durante todo o tempo do teste ou dos retestes. A temperatura (24 ± 2) e altura da coluna de água ± 18 cm são controladas. A água do recipiente foi trocada ao final de cada sessão de nado forçado assim, cada animal era inserido em água limpa. O mesmo animal passa por essas três exposições durante o protocolo, sendo o teste no primeiro dia, o reteste 1 realizado 7 dias depois e o reteste 2 realizado 7 dias depois do reteste 1 totalizando assim 14 dias de experimento. Ao final de cada sessão de nado forçado os animais foram gentilmente retirados e secos

com pano e inseridos em uma caixa com luz vermelha para aquecê-los antes de voltar à caixa-viveiro.

Todos os animais tiveram suas sessões de teste gravadas por uma câmera posicionada acima do recipiente de teste, e essas gravações foram utilizadas para posterior avaliação pelo software EthoWatcher (Crispim Junior *et al.*, 2012).

3.6 Descrição e análise dos comportamentos

Baseado no catálogo comportamental desenvolvido para ratos (Mezadri *et al.*, 2011), os seguintes comportamentos foram analisados com auxílio do software EthoWatcher (Crispim Junior *et al.*, 2012). Todos os vídeos eram codificados para que o analisador não soubesse qual era o fármaco ou a via de administração.

- Imobilidade: Determinada pela ausência de movimentos exceto, pequenos e ocasionais movimentos provavelmente necessários para a manutenção da cabeça fora da água.

- Escalada: Determinada a partir de movimentos verticais das patas dianteiras, dirigidos principalmente às paredes do recipiente, similares a tentativa do animal “escalar” o aparato.

- Nado: Determinado pelo movimento horizontal das patas dianteiras do animal gerando deslocamento do corpo pela superfície da água.

O relatório final fornecido pelo software oferecia os seguintes parâmetros obtidos ao longo dos períodos do teste ou reteste: Duração: Tempo total em segundos dos comportamentos acima citados; Latência: Tempo em segundos necessário para o primeiro registro de determinado comportamento; Frequência: Números de vezes em que determinado comportamento é realizado.

3.7 Eutanásia:

Os animais foram eutanasiados a partir de dessangramento sob anestesia (perfusão intracardíaca com solução salina e fixação com solução de formaldeído 4%). Os animais foram anestesiados com Uretana (35%, Sigma, U 2500) em uma sala distante do local da pia de perfusão (para evitar o contato olfativo com solvente ou sangue). Os animais somente foram levados para a sala da perfusão após um nível profundo de anestesia (ausência completa de reflexos de endireitamento) quando e onde os procedimentos de perfusão foram iniciados.

3.8 Revisão sistemática no Pubmed:

3.8.1 Critérios de inclusão:

1-critério de inclusão: estudos apresentando dados do teste de Porsolt para camundongos suíços, machos, adultos (90 dias) tratados por via oral.

3.8.2 Critérios de Exclusão:

2.1. Estudos apresentando dados do teste de Porsolt para camundongos não Suíços; 2.2. Estudos apresentando dados de camundongos em outros testes comportamentais; 2.3. Estudos apresentando dados de fêmeas de camundongos; 2.4. Outras vias de administração que não a oral; 2.5. Estudos apresentando dados de camundongos suíços machos mais jovens ou mais velhos que 90 dias.

Etapas de aplicação dos critérios de inclusão e exclusão para a seleção de referências:

1-Exame do abstract e se necessário,

2-Exame da sessão do material e métodos do manuscrito completo.

Dados extraídos das referências selecionadas: 1-autor, 2-dose e N de animais do respectivo fármaco, 3-Ciclo de luz, 4- horário do experimento; 5-estatística utilizada para comparação entre o grupo tratado e controle, 6-tempo entre a administração e o teste e o 7-período do teste no qual a variável dependente foi registrada, 8-porcentagem de imobilidade em relação ao controle encontrados na literatura, 9-leitura cega ou não, 10-animais distribuídos de forma aleatória.

4. CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizado com o auxílio do software Statistica. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e para a determinação de homogeneidade de variância o teste de Levene. As análises multifatoriais foram realizadas utilizando ANOVA de uma via. As comparações entre dois grupos foram feitas utilizando o teste “t” de Student e os dados da repetição foram analisados usando ANOVA de 2 vias com medidas repetidas. Aplicamos arbitrariamente o teste “t” para comparar um grupo tratado com o controle quando observamos diferenças entre em os grupos que eram maiores que 20% do valor do controle. Segundo Castagne *et al.* (2009) o teste “t” pode ser aplicado à análise dos dados do TNF para reduzir a incidência de erros do tipo II. A categorização dos camundongos em grupos de alta imobilidade (*high immobility*, HI) ou baixa imobilidade (*low immobility*, LI) foi feita de acordo com Enriquez-Castillo *et al.* (2008) e consistiu do cálculo da mediana a partir de tempos de imobilidade de todos os animais nos 6 minutos totais das sessões de teste ou de cada um dos retestes (Exceto EXP 6).

5. RESULTADOS

5.1 Análise Qualitativa dos comportamentos dos animais do grupo Controle Total no TNF-r. Uma descrição dos comportamentos de animais naïve.

Tratando-se de uma nova forma de avaliação dos efeitos das drogas através do teste do nado forçado para camundongos Suíços machos buscamos descobrir o comportamento do animal que não passou por nenhuma administração e somente passou pelo teste. As latências da imobilidade e do nado diminuíram nos retestes, ou seja, os animais realizaram determinada tarefa mais cedo no reteste 2 (Tabela 3). A latência média da imobilidade no teste foi de $40,93 \pm 12,9$ segundos no teste, enquanto no reteste 2, foi de apenas $5,47 \pm 1,2$ segundos (Tabela 3). Para o nado a latência no teste foi de $2,6 \pm 0,64$ para $0,4 \pm 0,1$ no reteste 2 (Tabela 3). Portanto, o primeiro parâmetro registrado no TNF-repetido é o nado, seguido da imobilidade. O valor da latência da escalada parece ser um parâmetro muito variável talvez porque o registro de escalada seja um evento raro (Tabela 3). Em relação à frequência houve, com a repetição das sessões, um aumento de pelo menos 4 vezes no número de episódios de imobilidade e de nado (Tabela 3). A duração de imobilidade também aumentou com as repetições do teste enquanto a duração do nado diminuiu (Tabela 3). Existe aumento significativo da duração da imobilidade no reteste 2 se comparado ao teste ($p=0,001$) e consequente diminuição do tempo de nado ($p=0,001$) (Tabela 3). As frequências também aumentaram significativamente em relação a sessão teste ao decorrer da sessão, onde a frequência da imobilidade no reteste 2 foi significativamente maior em relação ao teste $p=0,0001$ e em relação ao reteste 1 ($p=0,0009$). Assim como a imobilidade as frequências de nado também aumentaram no reteste 2 em relação ao teste e reteste 1 ($p=0,0001$) e ($p=0,0004$) respectivamente. Quanto a latência na imobilidade houve uma redução do tempo significativa em relação aos retestes 1 e 2 respectivamente ($p=0,001$) em relação ao reteste 1 e ($p=0,02$) em relação ao reteste 2 e a latência do nado foi menor no reteste 1 em relação ao reteste 2 ($p=0,03$). A escalada não apresentou diferenças em nenhum dos parâmetros analisados. Em resumo, a repetição do TNF faz com que os episódios de imobilidade

ocorram cada vez mais cedo em oposição aos episódios de nado. A repetição do TNF aumenta a duração da imobilidade e reduz a de nado sem afetar os parâmetros de escalada.

Tabela 3: Latência, Frequência e Duração das categorias imobilidade, nado e escalada do grupo Controle Total nas sessões do TNF-r.

	Sessão	Latência (s)	Frequência	Duração (s)
Imobilidade	Teste	40,9±12,9\$&	4,2±2,1	197,7 ± 20,90
	Reteste 1	9,7±4,6	7,7±1,2	252,9 ± 18,68 *
	Reteste 2	5,4±1,2	15,5±2,18*#	291,8 ± 17,66 *
Nado	Teste	2,6±0,64	4,5±0,72	152,6 ± 21,32
	Reteste 1	0,06±0,01	6,7±1,2	102,6 ± 19,00 *
	Reteste 2	0,4±0,1#	16,6±2,5*#	60,1 ± 17,11 *
Escalada	Teste	1,9±1,93	0,11±0,11	1,9± 1,9
	Reteste 1	0±0	0±0	0,0
	Reteste 2	88,4±37,2	2±0,4	5,04 ± 1,91

Dados expressos em média ± erro padrão de 9 camundongos. Anova de medidas repetidas com post-hoc de Duncan: Latência de imobilidade = F(2, 16)=8,2368, p=,00347 Post hoc = Teste p=0,001 em relação ao reteste 1 e p=0,02 em relação ao reteste 2 Latência de nado = F(2, 16)=3,2667, p=,06462 Post-hoc = Reteste 2 p=0,03 em relação ao reteste 1. Frequência de imobilidade F(2, 16)=18,565, p=,00007 Post-hoc = Reteste 2 p=0,0001 em relação ao teste e p=0,0009 em relação ao reteste 1. Frequência de nado = F(2, 16)=17,791, p=,00009 Post-hoc = Reteste 2 p=0,0001 em relação ao teste e p=0,0004 em relação ao reteste 1. Duração de Imobilidade = F(2, 16)=7,8933, p=,00412 Post-hoc = Reteste1 = p=0,03 e Reteste 2 p=0,001 Duração de Nado = F(2, 16)=8,0074, p=,00389 Post-hoc = Reteste 1 = p=0,04 e Reteste 2 p=0,001 * = significativamente diferente em relação a sessão teste. # significativamente diferente em relação a sessão reteste 1 \$ = Significativamente diferente em relação ao reteste 1 & = Significativamente diferente em relação ao reteste 2

A análise dos comportamentos de imobilidade, nado e escalada dos animais do grupo controle não-tratado quando feita minuto à minuto revela que no primeiro minuto do teste há uma predominância do nado (~ 40 segundos, Figura 2). Ao longo do tempo do teste este comportamento foi sendo substituído pela imobilidade que atinge o teto de aproximadamente 50 segundos no quinto minuto do teste (Figura 2). A escalada foi observada apenas ocasionalmente assim, os parâmetros da escalada são próximos de zero em todos os minutos do teste (Figura 2). Analisando o reteste 1 destes mesmos animais observa-se que ao repetirmos o teste 7 dias depois, os animais parecem diminuir o tempo de nado já no primeiro minuto, muito em decorrência, do aumento da imobilidade no mesmo período (Figura 3). O tempo para imobilidade atingir o teto também foi menor, chegando ao teto no quarto minuto do reteste 1 (Figura 3). Não houve registro de escalada no reteste 1 (Figura 3). O reteste 2 segue padrão similar ao do reteste 1 (Figura 4). O tempo de nado no primeiro minuto é baixo e o tempo de imobilidade já inicia próximo ao teto que é atingido antes no terceiro minuto do reteste 2, i.e., mais cedo que no teste e reteste 1. No reteste 2 observa-se também o comportamento escalada um pouco mais frequente, mas novamente não interfere nos resultados finais, uma vez que não passa de 5s no minuto 6 (Figura 4).

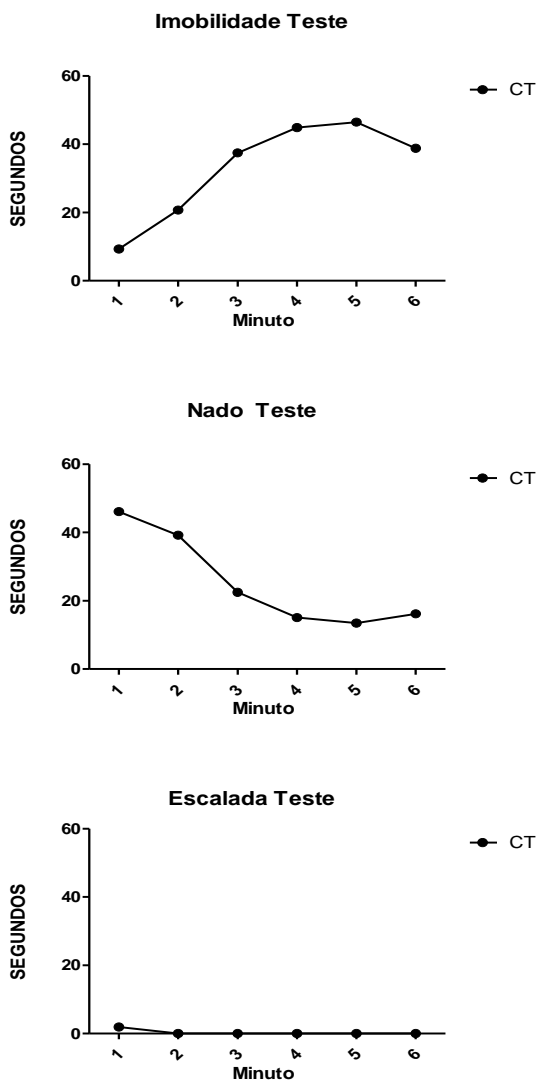


Figura 2: Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total na sessão teste (n=9).

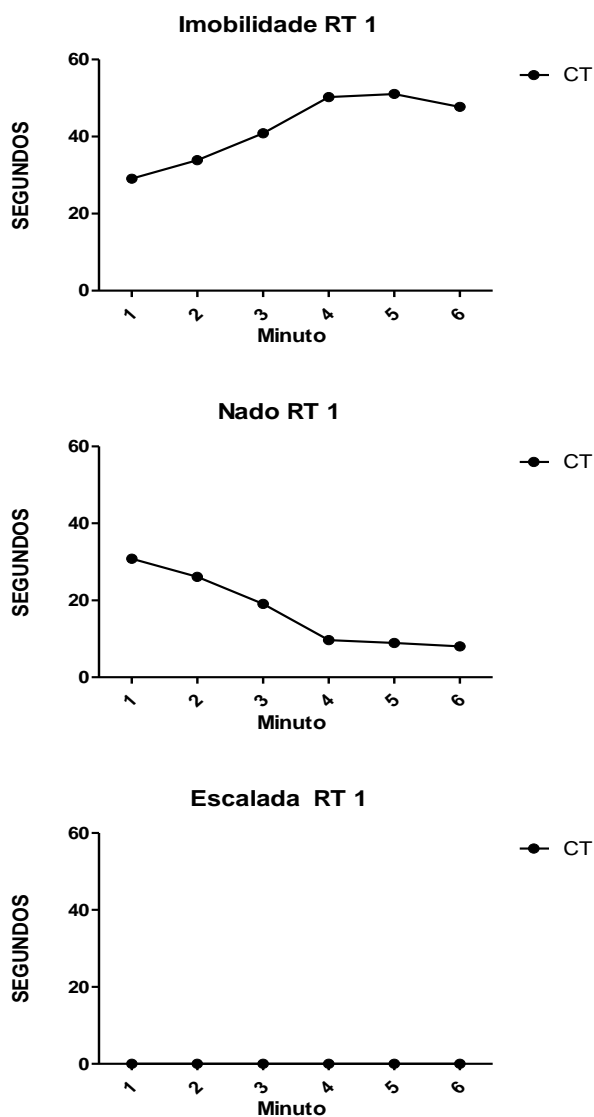


Figura 3: Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total na sessão reteste 1 (n=9).

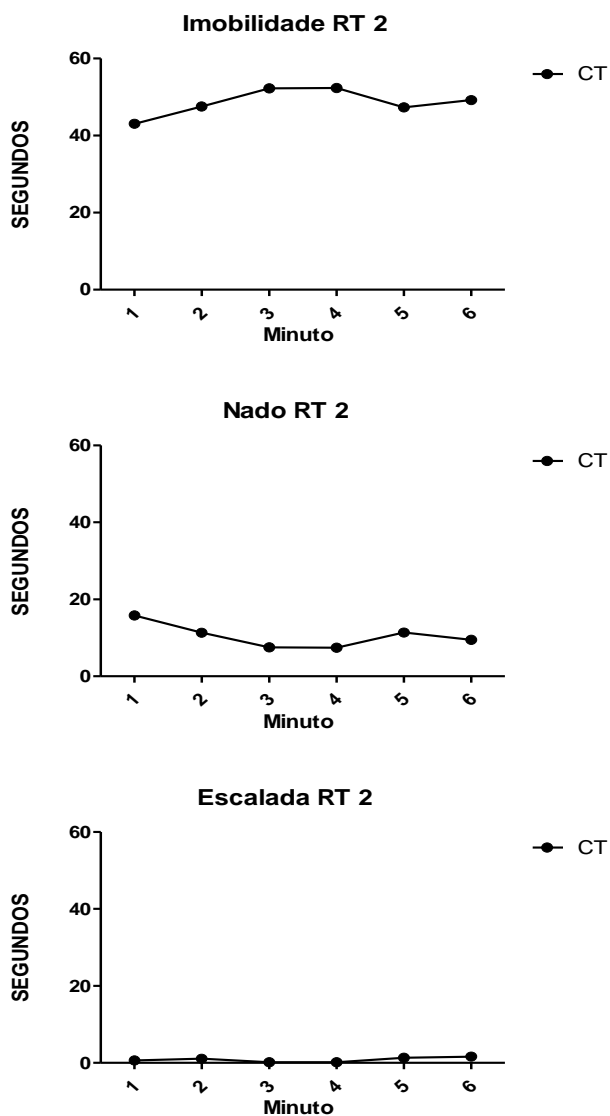


Figura 4: Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total na sessão reteste 2 (n=9).

Se analisarmos minuto à minuto os tempos dos comportamentos de imobilidade e de nado em cada sessão do TNF-repetido, observa-se um ponto de intersecção entre as curvas que descrevem a abundância destas categorias comportamentais. No teste o ponto de intersecção se dá por volta de 2,5 minutos do período da sessão (Figura 5). O ponto de intersecção diminui para o primeiro minuto no reteste 1 e desaparece no reteste 2 (Figura 5).

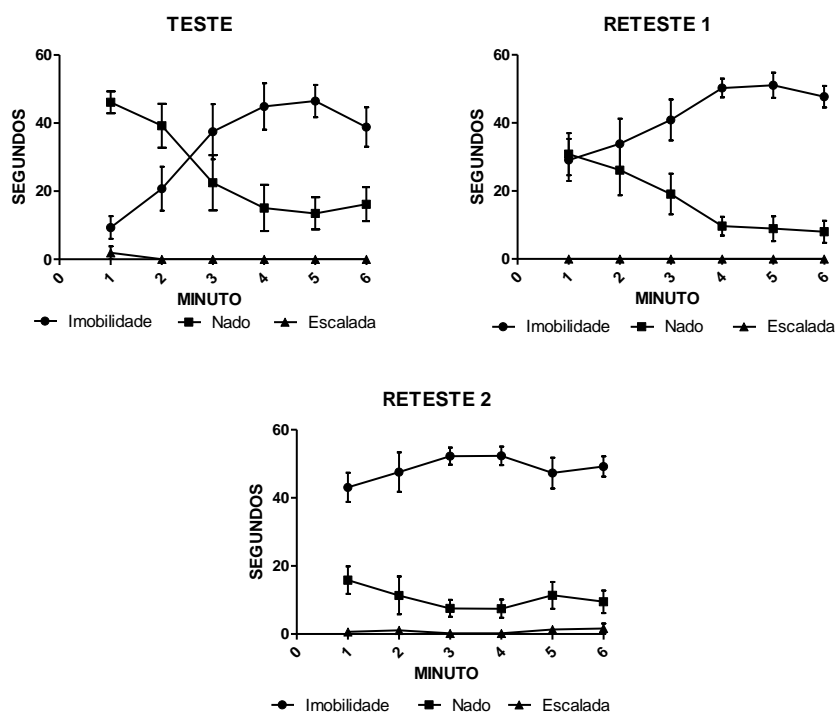


Figura 5: Duração dos comportamentos minuto à minuto do grupo controle total comparando imobilidade e nado em todas as sessões do TNF-repetido (n=9).

Os grupos controle de todos os experimentos foram analisados e são apresentados na tabela 4 que mostra a duração da imobilidade de todos os experimentos realizados incluindo o grupo controle total (EXP 1) e o grupo controle que recebeu a administração via IP. Um total de 56 animais fez parte destes grupos. A análise feita por ANOVA de uma via para cada sessão do TNF- α não detecta diferenças entre os grupos, embora observa-se que o grupo que recebeu o veículo via IP tenha uma menor duração no seu tempo de imobilidade no teste. Em uma ANOVA de medidas repetidas entre os grupos pareados, o fator tratamento não foi significativamente diferente [$F(4, 36)=1,6296$, $p=,18802$] mostrando que a sacarose não teve influência nos valores dos animais controles. Em relação ao fator repetição (exceto nos experimento 6, em que não houve as sessões reteste) há um aumento do tempo de imobilidade nas sessões reteste 1 e 2 que foram significativamente maiores ($p=0,0001$ e $p=0,00005$ respectivamente) que a sessão teste [$F(2, 72)=29,834$, $p=,000003$]. Observando os grupos individualmente este é um perfil que é observado praticamente em todos os experimentos, mesmo que em alguns apenas em uma das sessões reteste. É importante ressaltar que todos os grupos controle em nenhum momento diminuem o tempo de imobilidade com a repetição, mostrando que a sacarose administrada cronicamente possivelmente não teria efeito anti-imobilidade podendo mascarar algum efeito dos antidepressivos. Os dados encontram-se na tabela 4.

Tabela 4: Tempo de imobilidade dos grupos controle no teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r.

		Duração da imobilidade (s)		
EXP	N	Teste	Reteste 1	Reteste 2
1	9	197,7 ± 20,90	252,9 ± 18,68*	291,8 ± 17,66*
2	8	240,4 ± 17,76	325,5 ± 3,88*	319,2 ± 11,8*
3	8	258,3 ± 24,58	314,7 ± 8,79*	290,6 ± 23,97
4	8	260,1 ± 7,37	264,0 ± 18,42	313,6 ± 10,83*
5	8	234,8 ± 23,45	266,3 ± 35,40	318,8 ± 10,02*
6 (IP)	8	151,4 ± 43,47	NR	NR
6 (VO)	7	195,8 ± 34,74	NR	NR
Todos	56	219,8 ± 15,03	283,9 ± 9,72*	306,4 ± 7,05*

Dados representados em média ± E.P.M, ANOVA de uma via (diferenças entre os grupos independentes) ou ANOVA de medidas repetidas (entre os grupos pareados) com post-hoc de Duncan. EXP= experimento, IP= intraperitoneal, VO= via oral, N= número de animais. NR = Não realizado; * Significante em relação ao Teste $p < 0,05$

5.2 Análise quantitativa: Efeitos do tratamento com os antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.

A imobilidade e o nado foram as categorias comportamentais mais abundantes nos camundongos do grupo controle não-tratado em qualquer sessão do TNF-repetido. O comportamento de escalada foi raramente observado em todos os experimentos. Assim, os parâmetros de escalada não foram analisados nos experimentos farmacológicos. Os dados nos gráficos e figuras a seguir estão representados na forma da média do grupo e seu erro padrão da média (E.P.M). Os parâmetros foram totalizados em blocos de 6 minutos (período total de cada sessão), ou de 4 minutos (período final de cada sessão) ou de 2 minutos (período inicial de cada sessão) (Costa et al., 2013).

5.2.1. Experimento 1: Efeitos do tratamento com 1mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.

O experimento com a menor dose testada foi de 1mg/kg de FLX, BUP, DESI ou BS. Não houve diferenças significantes entre os

grupos controle ou tratados no TNF-repetido independente da forma de análise dos dados [6 minutos totais (Figura 6), 2 minutos iniciais (Figura 7) e 4 minutos finais (Figura 8)]. Na sessão teste, tanto os parâmetros de nado quanto os parâmetros de imobilidade dos grupos tratados com fármacos são muito similares ao do grupo CTRL, i.e., diferenças menores que 10% entre os tratamentos e o CTRL (Figuras 6-8). Os parâmetros de nado e imobilidade de todos os grupos nos retestes são semelhantes aos do teste (Figuras 6-8).

5.2.2. Experimento 2: Efeitos do tratamento com 3 mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.

No experimento com a dose de 3mg/kg de FLX, BUP, DESI ou BS não houve diferenças significantes entre os grupos controle ou tratados no TNF-r independente da forma de análise dos dados [6 minutos totais (Figura 9), 2 minutos iniciais (Figura 10) e 4 minutos finais (Figura 11)]. Nas sessões de teste e retestes, tanto os parâmetros de nado quanto os parâmetros de imobilidade dos grupos tratados com fármacos foram muito similares aos do grupo CTRL (Figuras 9-11). Os resultados deste grupo assemelham-se aos encontrados no grupo 1mg/kg, i.e., diferenças menores que 20% entre os tratamentos e o CTRL.

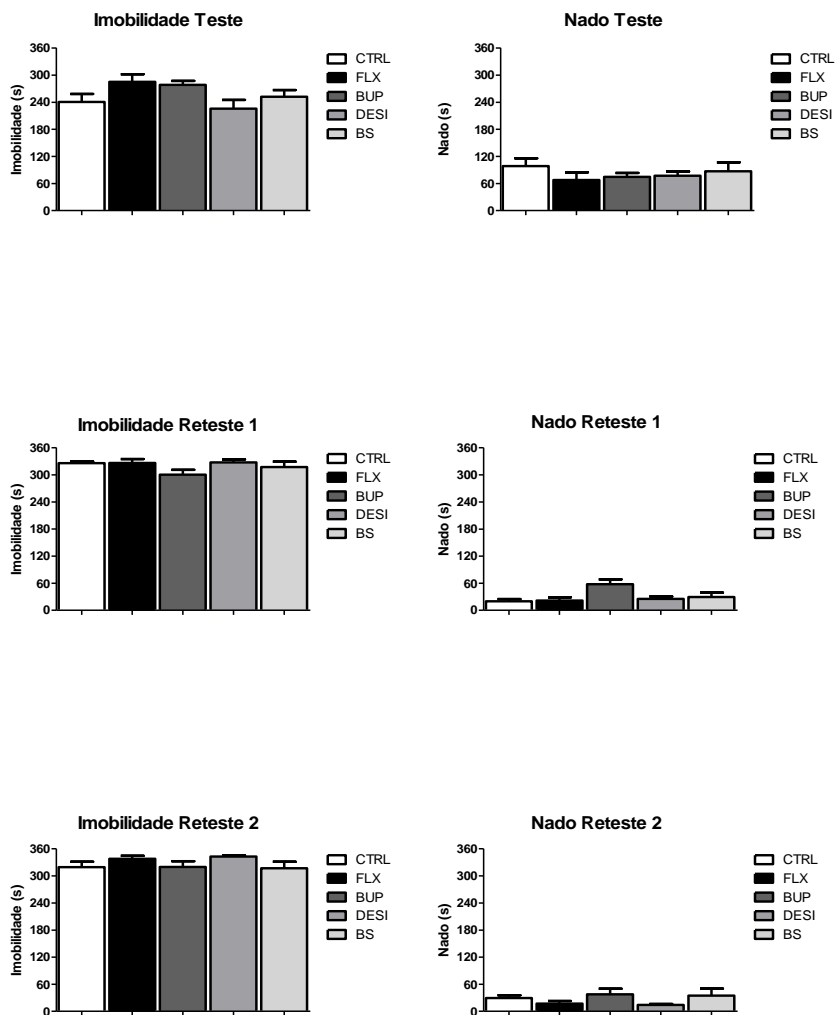


Figura 6: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 1mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões de teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

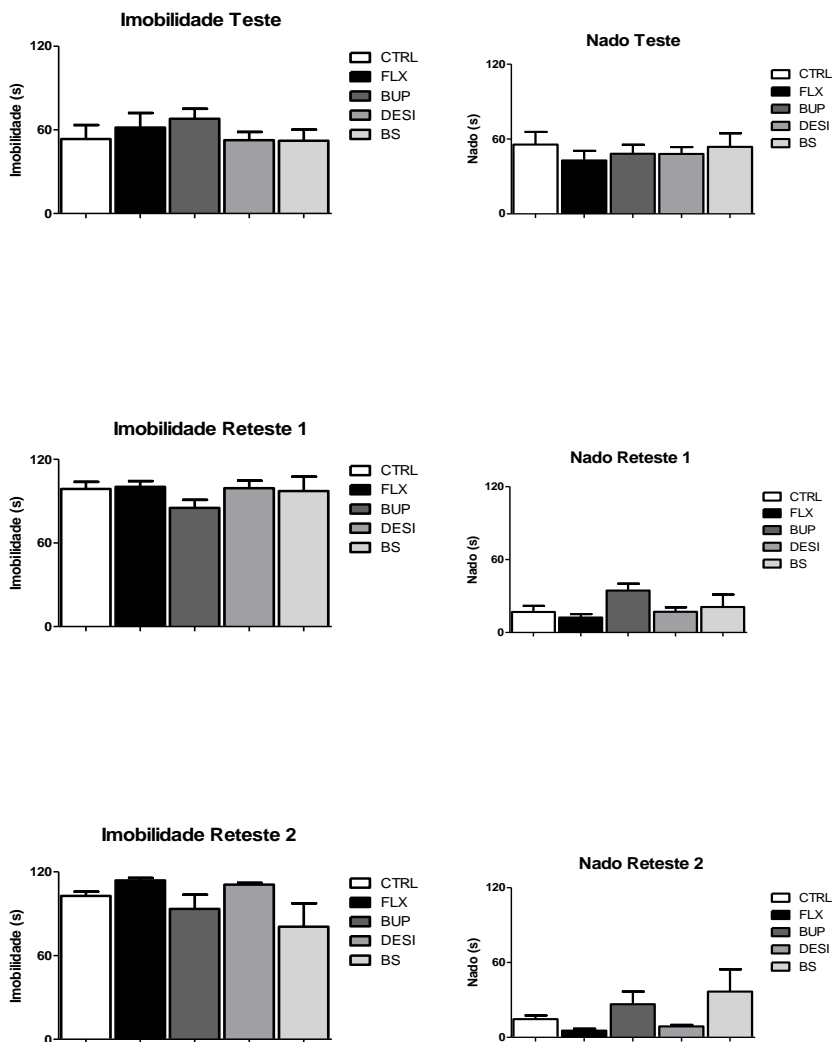


Figura 7: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 1mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

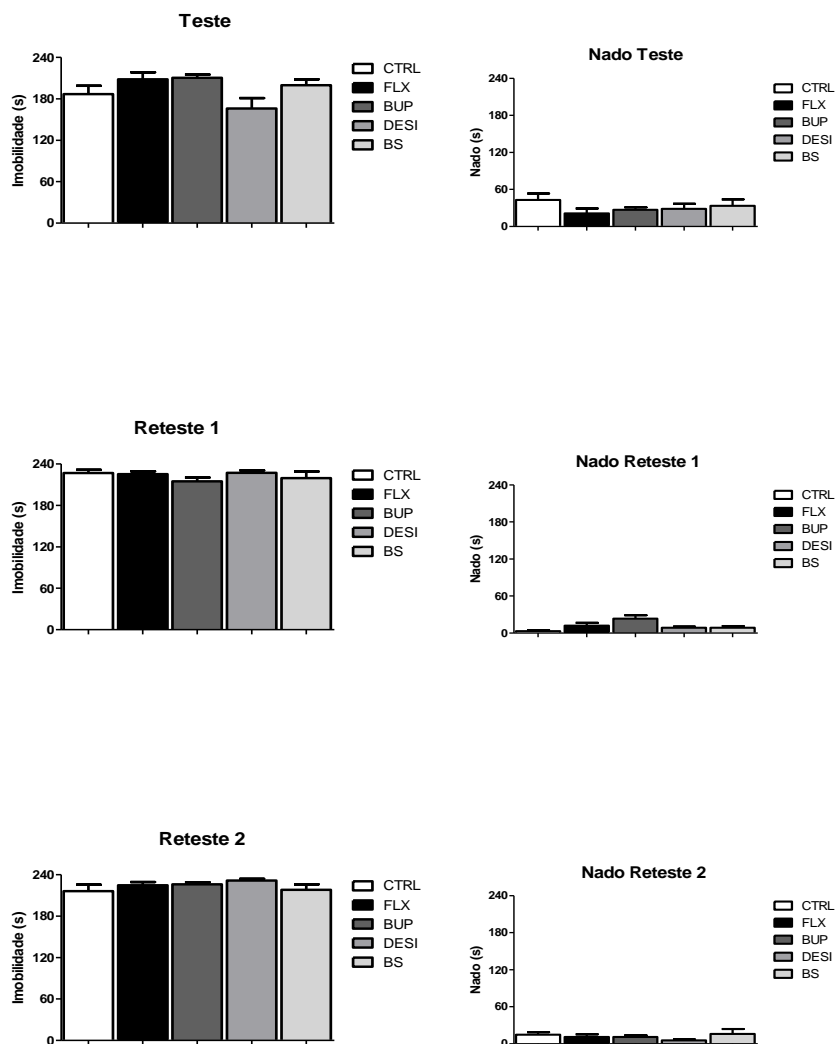


Figura 8: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 1mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

5.2.3. Experimento 3: Efeitos do tratamento com 10 mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.

No experimento com a dose de 10 mg/kg de FLX, BUP, DESI ou BS não houve diferenças significantes entre os grupos controle ou tratados no TNF-r independente da forma de análise dos dados [6 minutos totais (Figura 12), 2 minutos iniciais (Figura 13) e 4 minutos finais (Figura 14) quando a ANOVA de 1 via foi utilizada para a análise estatística. Porém neste experimento observamos que alguns tratamentos produziram diferenças maiores que 20% com relação ao CTRL. Desta forma, optamos pela análise utilizando o teste “t”. Segundo Bogdanova *et al.* (2013) o teste “t” é indicado e pode ser utilizado para comparar grupos controle e tratado no teste do nado forçado para se evitar Erro do tipo II.

Quando aplicamos o teste “t” para comparar cada grupo tratado com o grupo CTRL se observa que o grupo BUP tem tempo de imobilidade significantemente menor que o grupo CTRL na sessão teste ($p=0,02$, Figura 15), mas não nos retestes. O mesmo acontece no grupo BS que se comparado ao grupo CTRL possui menor tempo de imobilidade somente na sessão reteste 1 ($p=0,04$, Figura 17). Em ambos os casos ocorre um aumento concomitante do tempo de nado dos animais pertencentes a esses grupos ($p=0,02$ e $p=0,04$, Figuras 16 e 18 respectivamente). As diferenças significantes entre os grupos CTRL e tratados foram observadas quando os parâmetros foram totalizados no período de 6 minutos da sessão, mas não nos 2 minutos iniciais ou 4 minutos finais (Figuras 12 e 13).

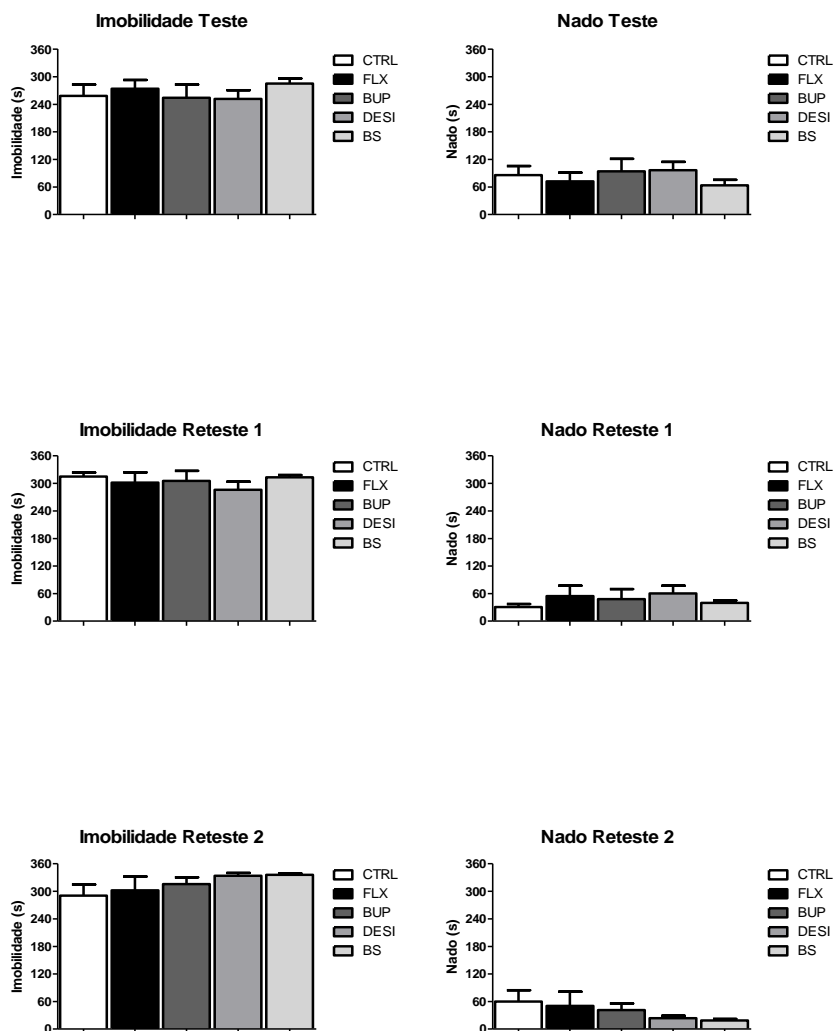


Figura 9: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 3mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

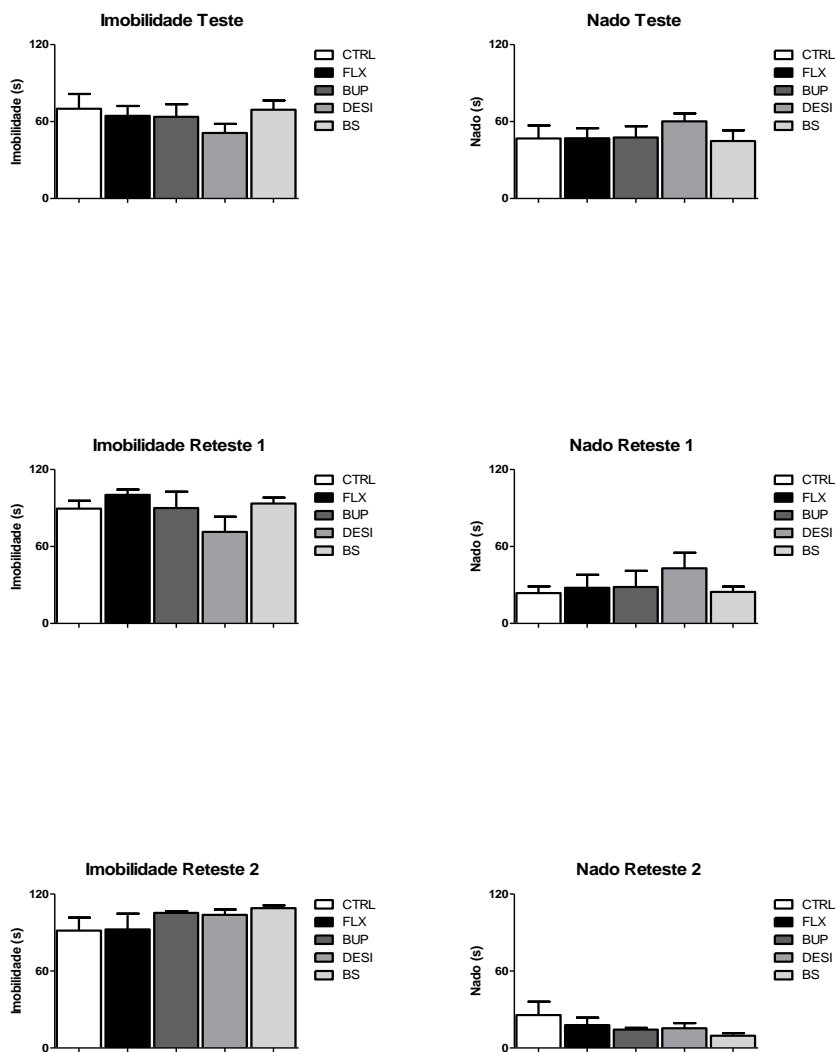


Figura 10: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 3mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

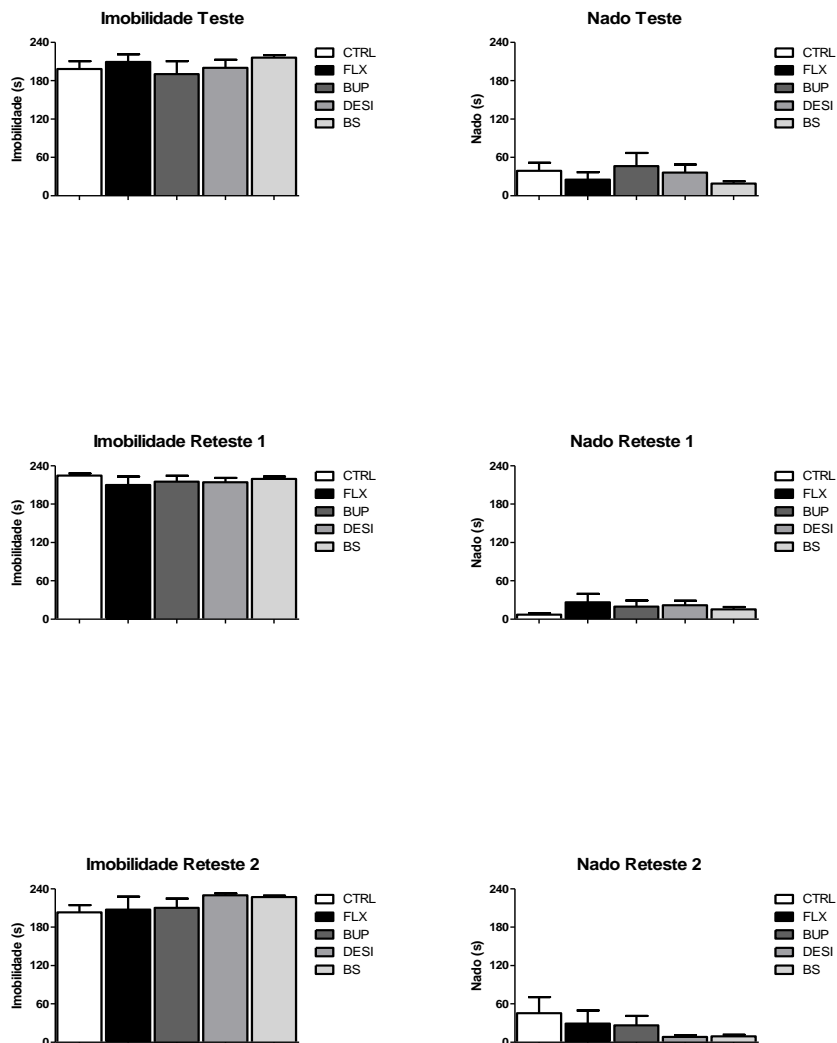


Figura 11: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 3mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

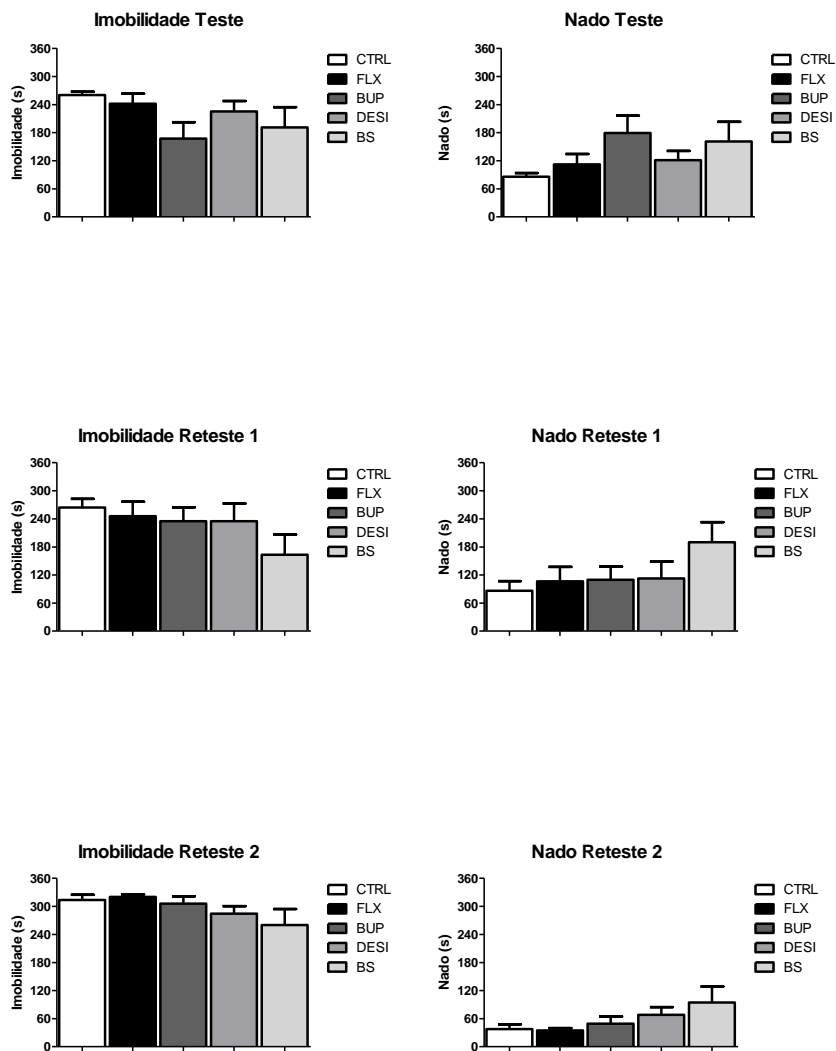


Figura 12: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 10mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

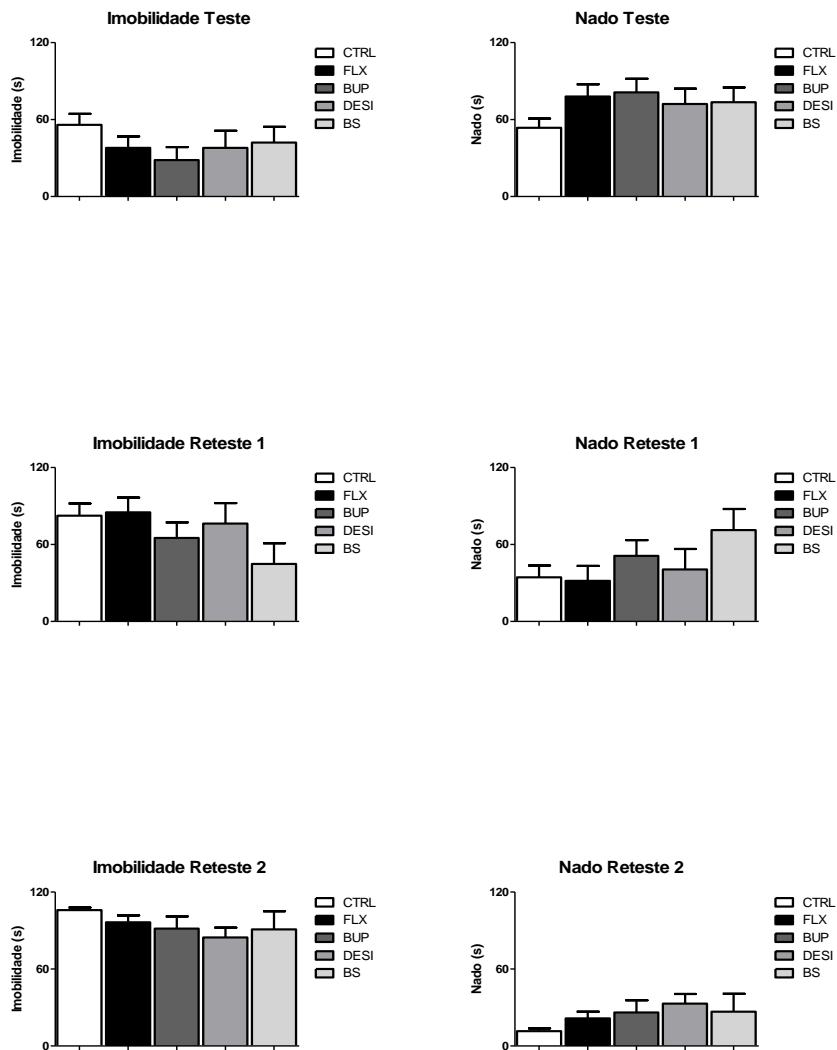


Figura 13: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 10mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

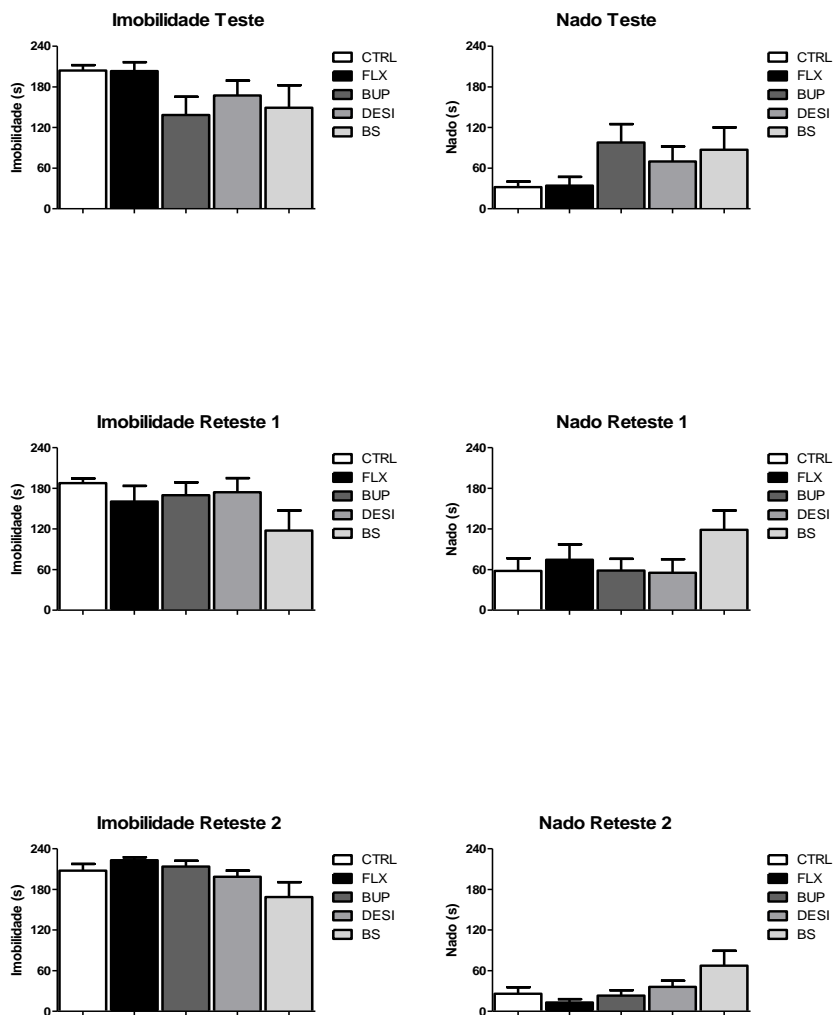


Figura 14: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 10mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

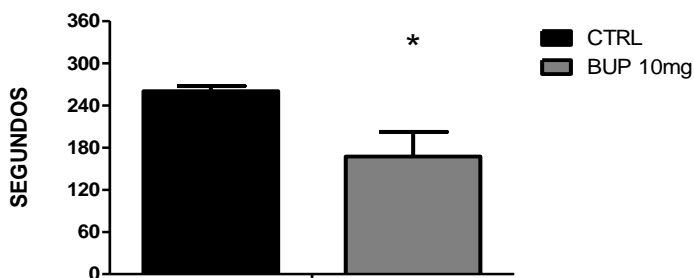


Figura 15: Diminuição da imobilidade do grupo BUP 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão teste nos 6 minutos totais $p < 0,05$ ($n=8/\text{grupo}$). As barras representam a média + E.P.M. * = Significativamente diferente em relação ao controle. Teste T = $p=0,02$

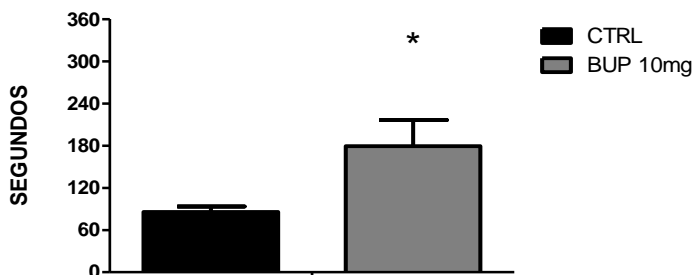


Figura 16: Aumento do nado no grupo BUP 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão teste nos 6 minutos totais $p < 0,05$ ($n=8/\text{grupo}$). As barras representam a média + E.P.M. * = Significativamente diferente em relação ao controle. Teste T = $p=0,02$

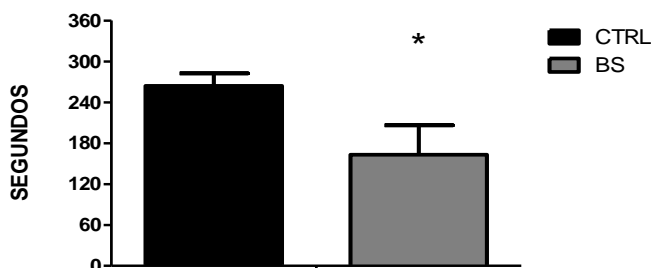


Figura 17: Diminuição da imobilidade do grupo BS 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão reteste 1 nos 6 minutos totais $p < 0,05$ ($n=8/\text{grupo}$). As barras representam a média + E.P.M. * = Significante diferente em relação ao controle. Teste T = $p=0,04$

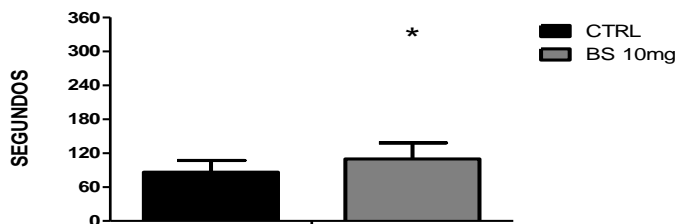


Figura 18: Aumento do nado no grupo BS 10mg/kg em relação ao grupo controle na sessão reteste 1 nos 6 minutos totais $p < 0,05$ ($n=8/\text{grupo}$). As barras representam a média + E.P.M. * = Significante diferente em relação ao controle. Teste T = $p=0,04$

5.2.4. Experimento 4: Efeitos do tratamento com 30 mg/kg de cada um dos antidepressivos sobre os comportamentos nas sessões teste e retestes 1 e 2 do TNF-r.

No experimento com a dose de 30 mg/kg de FLX, BUP, ou BS não houve diferenças significantes entre os grupos controle ou tratados no TNF-r, independente da forma de análise dos dados [6 minutos totais (Figura 19), 2 minutos iniciais (Figura 20) e 4 minutos finais (Figura 21)]. Neste experimento a DESI não foi utilizada. Nas sessões de teste e retestes, tanto os parâmetros de nado quanto os parâmetros de imobilidade dos grupos tratados com fármacos foram muito similares ao do grupo CTRL (Figuras 19-21). Os resultados deste grupo assemelham-se aos encontrados no grupo 1 e 3 mg/kg, i.e., todas as diferenças entre os tratamentos e o CTRL foram menores que 20%.

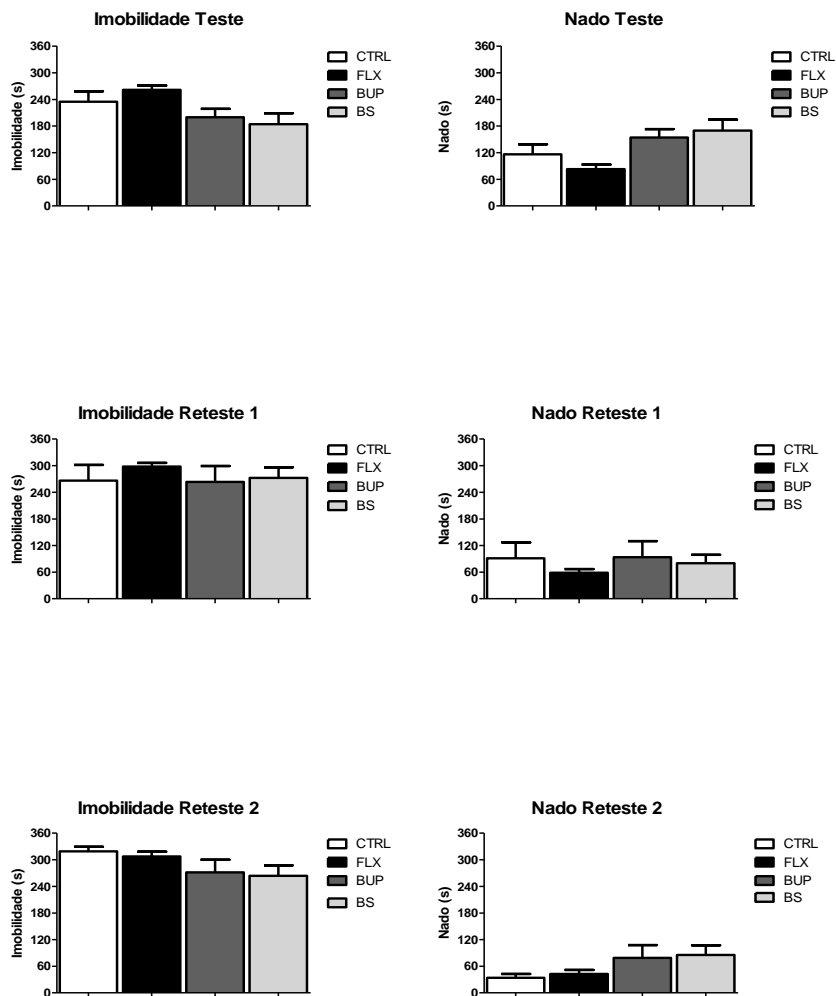


Figura 19: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 30mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF- α nos 6 minutos totais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

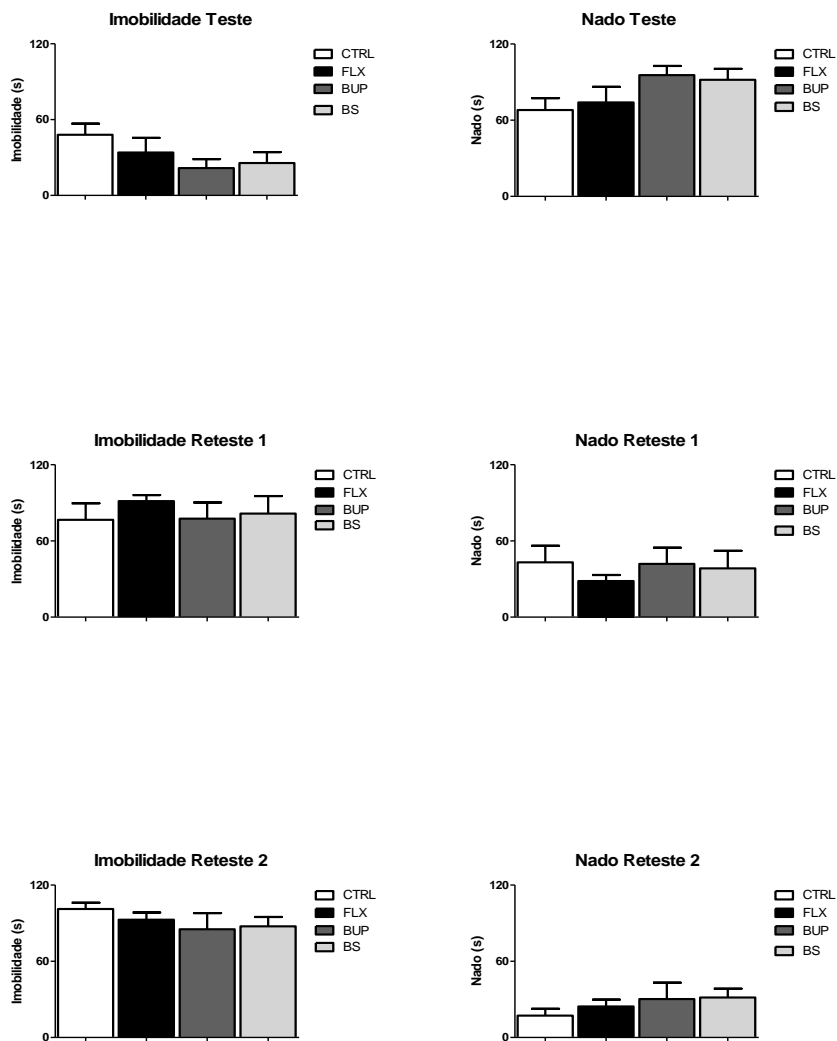


Figura 20: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 30mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, TNF-r nos 2 minutos iniciais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

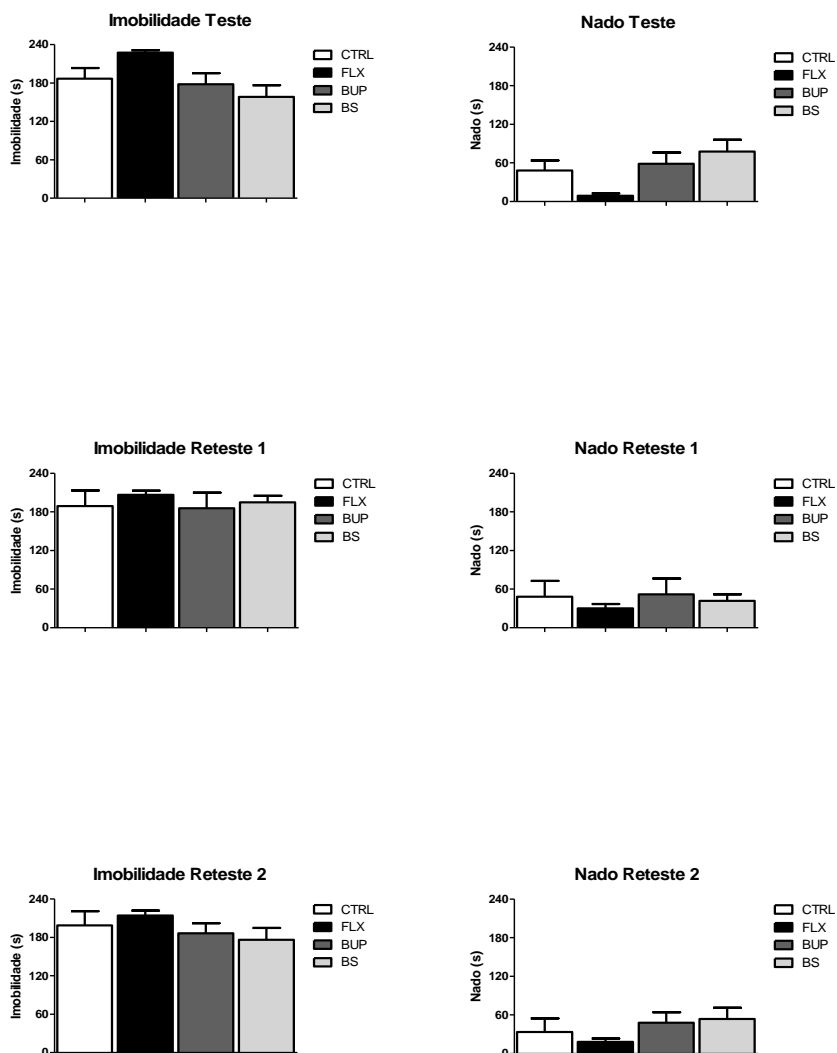


Figura 21: Duração da imobilidade e nado dos animais administrados com 30mg/kg de FLX, BUP, DESI, BS e do grupo controle nas sessões do teste, reteste 1 e reteste 2 do TNF-r nos 4 minutos finais (n=8/grupo). As barras representam a média + E.P.M

5.2.5. Experimento 6: Seleção de uma dose de fluoxetina efetiva no TNF a partir da literatura e a comparação dos efeitos do tratamento com 20 mg/kg de fluoxetina administrada por gavagem ou intraperitoneal sobre os comportamentos na sessão teste de Porsolt.

Para a selecionarmos a dose mais efetiva para camundongos suíços machos realizamos uma pequena revisão que mostrou que a dose mais utilizada para esta linhagem era a dose de 20mg/Kg de FLX (Dhingra e Chhillar, 2012; Dhingra e Valecha, 2014; Haj-Mirzaian *et al.*, 2015; Sashidhara *et al.*, 2015; Sales e Joca, 2016). No experimento realizado com a dose selecionada a partir desta revisão (20mg/Kg) a FLX foi administrada via IP e por via oral, e também não demonstrou diferenças significantes entre os tratamentos, independente da via de administração. O grupo que recebeu a FLX por via IP (figura 22) foi similar ao grupo que recebeu apenas salina 0,9%, portanto ineficaz em reverter o estresse. O grupo que recebeu a droga por via oral (figura 23) também não foi eficaz, e embora tenha obtido um menor de tempo de imobilidade que o grupo controle, não foi significativamente diferente ao grupo controle.

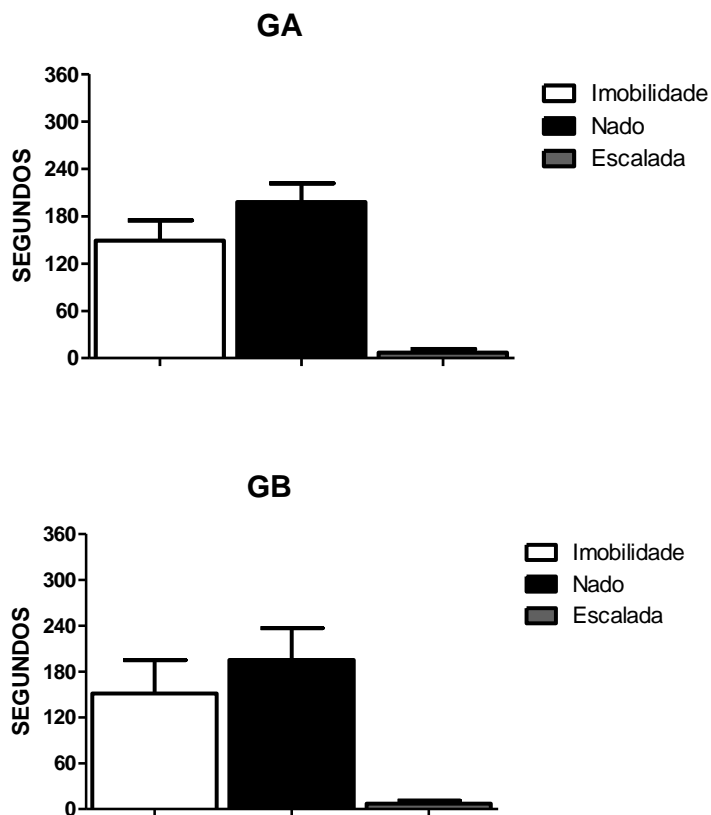


Figura 22: Tempos de imobilidade, nado e escalada do grupo FLX 20mg administrados por via IP. GA = FLX 20mg. GB = Controle Salina 0,9% (n=7 e 8 respectivamente).

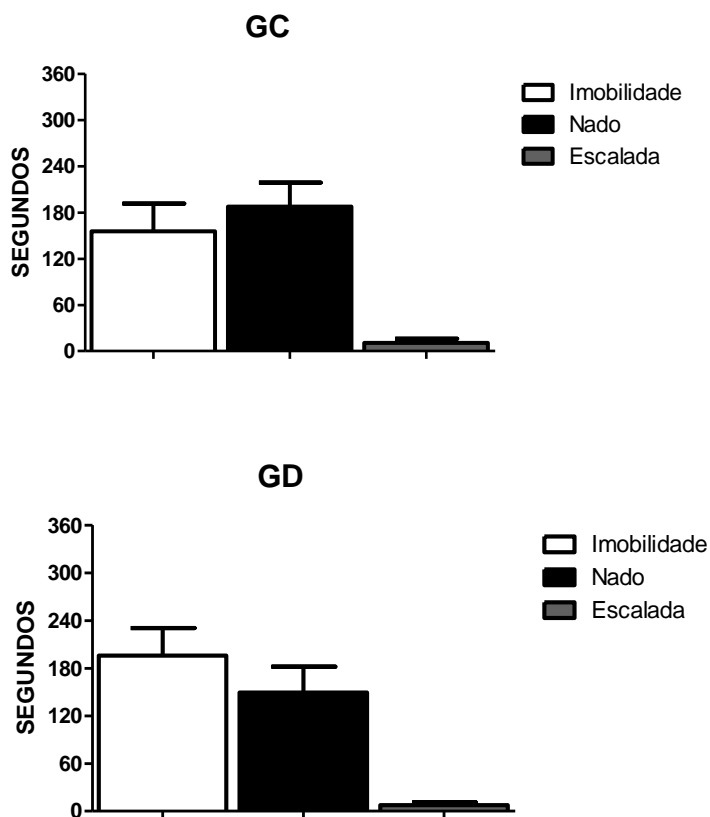


Figura 23: Tempos de imobilidade, nado e escalada do grupo FLX 20mg administrados por via oral. GC = FLX 20mg GD = Controle sacarose 10% (n=8 e 7 respectivamente).

5.3. Revisão sistemática e a frequência de resultados negativos encontrados na literatura.

Os critérios de inclusão e exclusão da revisão sistemática estão descritos na sessão Material e Métodos. A seguir os dados obtidos a partir destes critérios.

5.3.1 Palavras chave: *mice AND forced swimming test AND fluoxetine.*

Em 07 de dezembro de 2015 havia um total de 226 publicações com estas palavras chave no Pubmed. Foram selecionadas 7 publicações que se encaixavam em todos os critérios de inclusão sendo assim 3,09% do total de publicações. Entre os trabalhos publicados e que não se encaixaram nos critérios de inclusão 39,26% eram animais de outras linhagens que não camundongos suíços, 37,89% administravam as drogas por outra via, 7,76% representam trabalhos sem acesso, ou por não estarem disponíveis para acesso em nenhuma plataforma online, ou por estarem em outras línguas que não o inglês (chinês, russo, indiano). O sexo e a idade dos animais correspondem a 7,3% das exclusões cada.

Tabela 5:Revisão sistemática utilizando as palavras chave *mice AND forced swimming test AND fluoxetine*.

Referência	1	2*	3	4	5**	6**	7***
Parâmetro							
Dose em mg/kg, (N)	10 e 20, (5-8)	20, (7-9)	20, (8)	10, (6)	10, (8)	20, (8)	20, (8)
Ciclo de luz (invertido?)	Não	Não	Não	NR	Sim	Não	Não
Horário do experimento	NR	NR	NR	NR	10:00 às 16:00	NR	NR
Tempo de administração	NR	NR	NR	60 min antes	120 min antes	30 min antes	60 min antes
Período do teste avaliado	6 min	6 min	4 min finais	4 min finais	Bloco s de 5s	4 min finais	4 min finais
Leitura cega	Sim	Sim	NR	NR	Sim	NR	NR
Aleatorização	NR	NR	NR	Sim	Sim	Sim	NR
Estatística	Anov	Anova/	Anova	Anova	Anova	Anova	Anova
Dados da literatura (imobilidade, % do controle)	10mg/kg- 0 20mg/kg – -33	- 41,67	-50	-35,96	-65,92	-41,41	- 41,67%

N= número de animais, NR= não relatado, Referências: 1- Lenzi et al. (2015); 2- Nascimento *et al.* (2015); 3- Bhatt *et al.* (2014); 4- Karve *et al.* (2013); 5- Pawar *et al.* (2009); 6- Pandey *et al.* (2008); 7- Ren *et al.* (2006). * Animais passaram por cirurgia; ** Protocolo de ratos; *** Crônico

5.3.2 Palavras chave: *mice AND forced swimming test AND bupropion*

Em 7 de dezembro de 2015 existiam 42 publicações no Pubmed com estas palavras chave das quais 2 se adequavam aos critérios totalizando 5% dos trabalhos já publicados. Em relação as exclusões

55% dos trabalhos utilizavam outras vias de administração que não oral, 30% apresentavam dados de animais de outras linhagens, 12,5% eram de outro sexo, 5% foram considerados sem acesso.

Tabela 6: Revisão sistemática utilizando as palavras chave *mice AND forced swimming test AND bupropione*

Referência	1	2*
Parâmetro		
Dose em mg/kg, (N)	10 e 30, (7)	20 (8)
Ciclo de luz (invertido?)	Não	Não
Horário do experimento	08:00 – 16:00	NR
Tempo de administração	30 min antes	30 min antes
Período do teste avaliado	6 min	4 min finais
Leitura cega	NR	NR
Aleatorização	NR	Sim
Estatística	Anova	Anova/ Dunnet
Dados da literatura (imobilidade, % do controle)	10 mg = - 50 30mg = - 69	-22,98

N= número de animais, NR= não relatado, Referências: 1- Jesse *et al.* (2010); 2- Pandey *et al.* (2008). * Protocolo de ratos

5.3.3 Palavras chave: *mice AND forced swimming test AND desipramine*

Na data de 07 de dezembro de 2015 havia um número total de 120 publicações com as palavras chave mice AND forced swimming test AND desipramine no Pubmed das quais apenas uma atendeu todos os critérios de inclusão 0,83% do total apenas. Em relação as exclusões

49% foram por animais de outras linhagens, 39,41% drogas administradas por outras vias que não a escolhida como critério, 10,92% correspondentes a publicações sem acesso, neste caso, principalmente publicações da década de 80, 3,3% animais de outro sexo e 2,52% animais mais jovens ou mais velhos em relação à idade escolhida como critério de inclusão.

Tabela 7: Revisão sistemática utilizando as palavras chave *mice AND forced swimming test AND desipramine*

Referência	1
Parâmetro	
Dose em mg/kg, (N)	20, (8)
Ciclo de luz (invertido?)	Não
Horário do experimento	NR
Tempo de administração	30 min antes
Período do teste avaliado	4 min finais
Leitura cega	NR
Aleatorização	Sim
Estatística	Anova/ Dunnet
Dados da literatura (imobilidade, % do controle)	-36.80%
Observações	Protocolo de ratos

N= número de animais, NR= não relatado, Referências: 1- Pandey *et al.* (2008).

5.3.4 Palavras chave: *mice AND forced swimming test AND sodium butyrate*

Apenas 3 publicações encontravam-se disponíveis no Pubmed com as palavras chave mice AND forced swimming test AND sodium butyrate na data de 7 de Dezembro de 2015 e nenhuma atendia aos critérios de inclusão desta revisão.

5.3.5. Comparação entre os dados do presente estudo com os dados da literatura

A partir dos dados obtidos pela revisão sistemática comparamos os nossos dados com os já publicados (Tabela 8). Apenas os resultados que eram de mesma droga e da mesma dose foram comparados e algumas das drogas como no caso do BS que não teve nenhuma publicação incluída na revisão não apresenta comparação. A tabela mostra que mesmo nas drogas que tiveram efeito se comparadas ao controle, a porcentagem de redução da imobilidade dos nossos animais é menor que os dados encontrados na literatura.

Tabela 8: Redução de imobilidade em relação ao grupo controle em relação aos dados obtidos da revisão sistemática.

Tratamento	Dose	Imobilidade (% do controle)	Dados da literatura (imobilidade, % do controle)	Referências
BUP	10 mg/kg	- 35,77%	- 50%	Jessé <i>et al</i> , 2010
	30 mg/kg	- 15,32%	- 69%	Jessé <i>et al</i> , 2010
BS	10 mg/kg	- 26,54%	-	-
	30 mg/kg	- 22,13%	-	-
DES	10 mg/kg	- 13,46%	-	-
	-	-	-	-
FLX	10 mg/kg	- 7,31%	-35,96% - 65,92%	Karve <i>et al</i> , 2013; Pawar <i>et al.</i> , 2009
	30 mg/kg	+ 11,06%	-	-

6. DISCUSSÃO

6.1 O TNF-r e o camundongo suíço macho.

Com o TNF-r já validado para ratos machos por Mezadri *et al.* (2011), o objetivo deste trabalho foi avaliar, buscar a padronização e a validação do TNF-r para camundongos machos. Para isso, antes de qualquer coisa, tentamos entender o comportamento natural do animal nesta situação. O animal que chega até nós é cuidado e permanece no biotério do laboratório desde o dia de sua chegada com 21 dias até a eutanásia após a realização dos testes. Com isso buscamos total controle das variáveis que poderiam interferir nos resultados do teste, como por exemplo, evitar que os animais passem por enriquecimento ambiental que, como já observado por nosso laboratório e outros, interfere no resultado do TNF (Simpson e Kelly, 2011; Possamai *et al.*, 2015).

Os camundongos suíços no TNF-r iniciam a sessão teste com mais tempo de nado e menor imobilidade o que conforme o decorrer da sessão vai alternando, com o animal ficando mais tempo imóvel, i.e., menos ativo. A repetição faz com que estes animais comecem a ficar imóveis mais cedo a partir do reteste 1 chegando a iniciar praticamente no teto do tempo de imobilidade no reteste 2, o que também é demonstrado pela latência que é reduzida de 40,9 segundos no teste para 5,43 segundos no reteste 2. Estes resultados parecem fazer parte de uma estratégia comportamental que o animal assume ao ser inserido na situação de nado forçado e um efeito que pode indicar a ação estressora de repetidas e inevitáveis experiências incontrolláveis. A partir de tal situação estressante espera-se que haja o aumento da corticosterona, que promove alterações cognitivas, participando em funções como a consolidação da memória adicionando a possibilidade da memória estar envolvida nestes processos (Alcaro *et al.*, 2002; Molendijk e De Kloet, 2015). Ratos tem por comportamento usual na primeira vez que se deparam com o nado forçado de nadar e explorar a cuba, comportamento que após a segunda apresentação se torna menos frequente. O envolvimento do processo de memória pode explicar essa estratégia e o aumento na imobilidade no rato após a segunda apresentação ao teste (Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Em camundongos, a diferença no tempo de imobilidade entre a primeira e a segunda sessão de nado é muito pequena, o que também explica o fato

de não ser necessário o pré-teste nestes animais para que se observe o efeito anti-imobilidade dos antidepressivos. Assim, logo na primeira exposição camundongos já apresentam a imobilidade como estratégia e na repetição, como no rato, há o aumento do tempo de imobilidade mesmo quando esta repetição seja dias após a primeira exposição (Alcaro *et al.*, 2002; Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Este aumento da imobilidade com a repetição do teste poderia facilitar a detecção de fármacos com atividade antidepressiva. O tratamento com o veículo (sacarose 10%) também aumenta o tempo de imobilidade em função das repetições similarmente ao grupo CT e não aparente ter influência no tratamento dos animais.

6.2. Resposta comportamental dos camundongos suíços machos no TNF-r a administração aguda e crônica dos antidepressivos.

Em continuidade ao trabalho após verificarmos que os camundongos suíços machos respondem naturalmente com aumento do tempo de imobilidade ao TNF-r, testamos alguns dos compostos clássicos com atividade antidepressiva e como eles poderiam evitar que o aumento da imobilidade observado no TNF-r. De acordo com os dados obtidos em ratos machos (Mezadri *et al.*, 2011; Possamai *et al.*, 2015), o tratamento crônico com os antidepressivos deveria reduzir a imobilidade nas sessões de reteste do TNF-r. O TNF-r em ratos machos pode detectar doses diárias até 5 vezes mais baixas de fluoxetina quando comparadas ao teste de Porsolt (Mezadri *et al.*, 2011; Possamai *et al.*, 2015). Assim, com o objetivo de verificar a menor dose efetiva de cada substância para o experimento com os camundongos suíços machos no TNF-r partimos de uma dose pequena e não ativa no teste de Porsolt (1mg/kg) para estes camundongos (David *et al.*, 2003), aumentando para uma dose também sub efetiva de 3 mg/kg (Bourin *et al.*, 1998; Lucki *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2009). Posteriormente aumentamos 10 vezes cada dose, respectivamente para 10 mg/kg e 30 mg/kg, que de acordo com a literatura são consideradas efetivas em reduzir a imobilidade de camundongos suíços machos (Borsini e Meli, 1988; Lucki *et al.*, 1994; Borsini, 1995; Bourin *et al.*, 1998; Dulawa *et al.*, 2004; Jesse *et al.*, 2010; Lenzi *et al.*, 2015). Surpreendentemente, em nossas condições a administração por via oral das doses consideradas efetivas destas drogas em camundongos suíços machos não diminuiram

a imobilidade destes camundongos na sessão teste ou nos retestes do TNF-r. Estes dados contradizem até mesmo dados de nosso próprio grupo de pesquisa que indicaram que 30 mg/kg de FLX e DESI administrados por via IP reduziram a imobilidade de camundongos Suíços no teste de Porsolt (Costa et al., 2013). Vale ressaltar que estes últimos experimentos foram feitos entre 4-5 anos atrás, em outro laboratório, por outro experimentador e em camundongos suíços machos mantidos em ciclo de luz normal (Costa et al., 2013). A relevância de cada uma destas diferenças para o resultado final dos estudos merece investigações futuras.

Como esperado, na sessão teste do TNF-r as doses de 1 e 3 mg/kg de qualquer um dos fármacos tiveram perfis muito similares ao do grupo controle o que indicaria a inatividade das drogas nestas doses, como já observado anteriormente (Bourin *et al.*, 1998; Lucki *et al.*, 2001; David *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2009). O tratamento crônico por 7 ou 14 dias com qualquer dos fármacos nestas doses também não reduziu a imobilidade nos retestes, ao contrário ao esperado de acordo com os dados obtidos em ratos machos (Mezadri *et al.*, 2011; Possamai *et al.*, 2015). A diferença entre os tempos de imobilidade dos camundongos suíços machos tratados com veículo ou antidepressivos nas doses de 1 e 3 mg/Kg estiveram abaixo de 20% em todas as sessões do TNF-r. Dulawa *et al.* (2004) mostrou que em camundongos “inbred” (isogênicos) apenas a linhagem BALB/c respondeu ao tratamento oral crônico com FLX, no entanto somente a partir da dose de 10mg/kg, doses menores também não foram efetivas.

Esperávamos que o tratamento com as doses de 10 e 30 mg/kg dos antidepressivos por via oral pudesse reduzir a imobilidade dos camundongos suíços machos já na sessão de teste (Bourin *et al.*, 1998; Reneric e Lucki, 1998; Costa *et al.*, 2013). De acordo com a literatura, a redução da imobilidade em camundongos variaria de 50 a 70% para a BUP ou de 35, 96 a 65,92 para a FLX (Tabela 8). Em nossas condições o tratamento agudo com a BUP nas doses de 10 e 30 mg/kg reduziu a imobilidade em média de 36 e 15 %, respectivamente (Tabela 8). As análises de variância de uma via, paramétricas ou não paramétricas, não foram suficientemente sensíveis para detectar diferenças significantes entre a BUP e o CTRL. A ausência desta diferença pode ser em

decorrência de um erro do tipo II, i.e., o teste estatístico não considera significativa uma diferença que de fato existe. Assim, empregamos o teste “t” para reduzir a chance do erro do tipo II (Petit-Demouliere *et al.*, 2005; Castagne *et al.*, 2009) para avaliar a diferença entre o grupo BUP e controle. O teste “t” indica redução significativa da imobilidade após o tratamento com BUP 10 mg/kg, mas não com 30 mg/kg, quando comparado ao controle. Estes dados estão de acordo com a literatura para a dose de 10mg/kg (Bourin *et al.*, 1998; Reneric e Lucki, 1998) mas não para a dose de 30mg/kg. Segundo dados encontrados na literatura 30mg/kg de BUP, também em doses próximas a 30 (e.g 32mg) que é o caso dos trabalhos de Prica *et al.* (2008) e Bourin *et al.* (1998), seria efetiva em reduzir a imobilidade (Jesse *et al.*, 2010). Interessantemente, a redução da imobilidade promovida pela BUP 10 mg/kg no teste desaparece nos retestes.

A redução média do tempo de imobilidade com o tratamento com a FLX na dose de 10 mg/kg foi ainda menor (7,3 %) que o da BUP na mesma dose. Paradoxalmente, a dose de FLX 30 mg/kg aumentou em 11% o tempo de imobilidade no teste. Embora não significantes, as diferenças entre os tempos de imobilidade dos grupos de camundongos suíços machos tratados com a FLX ou veículo foram inesperadamente baixas de acordo com Karve *et al.* (2013) e Pawar *et al.* (2009) (35,96 a 65,92%). Porém, Lenzi *et al.* (2015) também não encontrou diferenças no grupo tratado com 10mg/kg por via oral em suíços machos, esses dados estão incluídos na revisão sistemática (Tabela 5). O tratamento crônico com a FLX 10 ou 30 mg/Kg não afetou os parâmetros de imobilidade ou nado nas sessões de reteste do TNF-r. Taksande *et al.* (2013) em uma administração crônica por 15 dias também não verificou diferenças entre a dose de 10mg/Kg de FLX e o veículo e também verificou aumento do tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle em camundongos suíços machos. A via de administração neste caso foi IP (Taksande *et al.* (2013). Em uma dose próxima de 30mg/Kg (e.g 25mg/Kg), Dulawa *et al.* (2004) também não observou efeito significativo na administração crônica de 21 dias. Neste caso a dose de 25mg/kg, não foi eficaz em reduzir o estresse em camundongos BALB/c que em um experimento de dose-resposta tinham respondido melhor que outras linhagens.

Em nossas condições a DESI 10 mg/kg reduziu em média 13,46% o tempo de imobilidade quando comparado ao veículo enquanto que o BS 10 e 30 mg/kg reduziu em média 26,54 e 22,13 % na sessão teste (Tabela 8). Não encontramos na literatura dados do teste de Porsolt obtidos a partir do tratamento de camundongos suíços machos com a DESI ou com BS por via oral nestas doses, impedindo uma comparação direta de nossos dados com a literatura (Tabela 8). Em outras linhagens de camundongos ou por outras vias (e.g IP) de administração se observa que a DESI na dose de 5 mg/kg já demonstra efeito, caso das linhagens DBA/2J, C57BL/6J e CD-1 (Lucki *et al.*, 2001). Para camundongos NIH Suíços o efeito da DESI foi observado apenas a partir da dose de 20mg/kg (Lucki *et al.*, 2001). Como não fizemos experimento com doses maiores que 10mg/kg para DESI não podemos saber se ela seria efetiva em nossas condições, na dose de 30mg/kg, por exemplo. O tratamento crônico com a DESI não afetou a imobilidade dos camundongos Suíços machos nos retestes. Em camundongos knock-out Briellaier *et al.* (2014) observaram efeito na redução da imobilidade dos animais que receberam DESI cronicamente por 21 dias por via oral na água de beber. Porém, por se tratar de um animal geneticamente modificado, não podemos saber se a desativação do gene em estudo pode ter interferido na resposta da droga.

Em outras linhagens de camundongos como a F1 um híbrido das linhagens 129SvEv and C57Bl/6 por via IP observa-se que o BS não foi efetivo em diminuir a imobilidade após uma administração aguda, mesmo que na dose de 100mg (Gundersen e Blendy, 2009). Ao ser administrado cronicamente por 21 dias, o BS, mesmo que sem efeito significativo, reduziu a imobilidade no teste de Porsolt (Gundersen e Blendy, 2009). Similar a isto, comparado ao veículo, o tratamento crônico com o BS mesmo em dose 10 vezes menor (10 mg/kg) reduziu significativamente a imobilidade dos camundongos Suíços machos no reteste 1, mas não significativamente no reteste 2.

6.3. Ausência dos efeitos esperados dos antidepressivos no teste de Porsolt: possíveis fontes de erro ou de variação experimental:

A ausência de efeito das doses supostamente eficazes dos antidepressivos na sessão teste do TNF-r poderia ser explicada por vários fatores. Petit-Demouliere *et al.* (2005) fizeram uma ampla revisão

que expõe como variações experimentais podem afetar os resultados obtidos no TNF em camundongos. Cabe destacar a contribuição de fatores como a idade do animal (Bourin *et al.*, 1998), a linhagem (David *et al.*, 2003), as condições de alojamento (Simpson e Kelly, 2011), a forma de administração se aguda ou crônica (Dulawa *et al.*, 2004), assim como, a via de administração podem ser variáveis e influenciar gerando potenciais vieses.

Para verificarmos se a via de administração utilizada era uma possível fonte de variação dos resultados encontrados fizemos um experimento comparando os efeitos de uma administração de FLX por via intraperitoneal (I.P) ou por gavagem uma hora antes do FST. A dose de fluoxetina escolhida, 20 mg/kg, foi a mais encontrada como efetiva no TNF após uma extensa revisão da literatura para camundongos suíços machos (Dhingra e Chhillar, 2012; Dhingra e Valecha, 2014; Haj-Mirzaian *et al.*, 2015; Sashidhara *et al.*, 2015; Sales e Joca, 2016). Utilizamos o protocolo clássico do teste de Porsolt para camundongos, onde os animais receberam a droga ou veículo via I.P uma hora antes do experimento, e passaram somente pelo teste. Um grupo controle e um tratado receberam as mesmas substâncias por gavagem. Este experimento foi totalmente cego ao experimentador (PRS), apenas a pessoa que preparou as drogas (KD) conhecia a identidade das substâncias contidas nos frascos usados para tratar os animais. Além disso, uma terceira pessoa (LCT) analisou os vídeos que eram identificados através de códigos. Assim como nos outros experimentos os vídeos eram nomeados com códigos de forma que o analisador não saberia qual a administração e nem o grupo analisado e os animais e grupos foram escolhidos de forma aleatória. De forma surpreendente novamente nenhum tratamento com a FLX foi efetivo em reduzir o tempo de imobilidade no FST (figuras 23 e 24). No entanto, estes animais passaram por enriquecimento ambiental (material para ninho, tubos de papel) antes de chegar até nós o que, como já citado anteriormente, pode afetar o resultado do TNF (Possamai *et al.*, 2015). Assim, no caso específico deste experimento o enriquecimento ambiental pode ter sido uma possível causa deste resultado negativo. Além disso, é possível que a via de administração não seja uma variável crítica para a ausência do efeito da FLX. Cabe destacar que a FLX utilizada neste experimento foi eficaz em reduzir a imobilidade em um

experimento de teste de Porsolt em ratos Wistar machos que ocorreu na mesma época dos nossos experimentos no mesmo laboratório (Domingues, 2015).

Uma observação feita durante as análises dos resultados é que os animais pareciam dividir-se em dois grupos distintos, independente do tratamento recebido. Alguns animais pareciam ter grandes tempos de imobilidade enquanto outros tinham tempos bem menores mesmo tendo recebido os mesmos fármacos. Alguns autores (Enriquez-Castillo *et al.*, 2008; Flores-Serrano *et al.*, 2013) observaram nos seus resultados no teste de Porsolt alguns de seus grupos mostravam a existência de subgrupos com maior ou menor tempo de imobilidade e ao dividi-los em grupos de alta imobilidade (HI) e baixa imobilidade (LI) detectaram diferenças em seus resultados comportamentais. Esta mesma observação foi feita em nossos grupos experimentais, e por isso resolvemos dividir todos os animais experimentais em HI (alta imobilidade) e LI (baixa imobilidade) seguindo o protocolo de Enriquez-Castillo *et al.* (2008). A partir de tempo de imobilidade de todos os animais que passaram pelos testes, calculou-se a distribuição destes valores e a partir da distribuição normal destes dados, calculou-se então o valor da mediana destes valores. Para a obtenção desta mediana, os valores de imobilidade de todos os animais (i.e n total de animais) foram utilizados independentemente do grupo ou via de administração. Na sessão teste animais acima com o valor do tempo de imobilidade nos 6 minutos totais acima do valor da mediana de 258,93 foram considerados animais HI e abaixo deste valor foram considerados animais LI. Utilizando um teste “t” para comparar o tempo de imobilidade de animais de uma mesma categoria tratado com veículo ou com fármaco (e.g. CTRL LI x FLX LI) encontramos diferenças grandes entre os tratamentos, especialmente no grupo de camundongos LI (Tabela 9). Os camundongos LI que receberam 10mg/kg de BS, BUP e FLX tiveram menor tempo de imobilidade se comparados com o grupo CTRL (Tabela 9). O tratamento com BUP 10 mg/kg também reduziu o tempo de imobilidade no subgrupo de animais HI. As diferenças entre o grupo BUP e CTRL são observadas mesmo sem a subdivisão nas categorias HI e LI. Tratamentos que não foram efetivos em nenhuma das análises anteriores passam a ser efetivos com a subdivisão dos animais em

categorias HI e LI, caso da FLX 10 mg/kg que em nenhum outro momento demonstrou ser efetiva.

No reteste 1 (Tabela 10) o valor da mediana do tempo de imobilidade para a divisão entre animais LI e HI foi maior, subindo para 305,78. Valores abaixo da mediana eram considerados LI e acima da mediana eram animais HI. Novamente observamos algumas diferenças que não apareciam antes. Nos animais classificados como LI, no grupo que recebeu 3mg/Kg existe uma diferença aparentemente significativa entre o grupo BUP e o grupo CTRL. O pequeno número de animais do grupo BUP (apenas um animal) impediu a realização da estatística. Nos animais que receberam 10mg/Kg o grupo BS diminui o tempo de imobilidade em relação ao grupo CTRL, resultado que já havia sido observado sem a subdivisão em grupos LI e HI. Em relação aos animais classificados com HI, na dose de 10mg/Kg os grupos BUP, BS e FLX aumentaram o tempo de nado em relação ao grupo CTRL. Este resultado pode ter ocorrido em função do pequeno número de animais do grupo CTRL fazendo com que os outros grupos tivessem maiores tempos de imobilidade significativamente diferentes. Já os animais da dose de 30mg/Kg diminuíram o tempo de imobilidade em relação ao grupo CTRL nos grupos BUP e FLX, o que é interessante porque o grupo FLX se analisado em sua totalidade é maior que o grupo CTRL no reteste 1.

No reteste 2 o valor da mediana para a subdivisão foi de 321,38 onde animais com tempo de imobilidade maior que este valor, eram classificados com HI e valores abaixo com LI. A única diferença significativa foi no subgrupo LI onde o grupo FLX 10mg/Kg teve um maior tempo de imobilidade em relação ao grupo controle. O subgrupo HI não apresentou nenhuma diferença significativa.

O pequeno número de animais em cada um dos subgrupos nos impede de confiar inteiramente nesta análise estatística, porém, a análise nos indica que a variação dentro do próprio grupo pode ser um fator importante e decisivo para que não tenha havido diferenças significantes entre os tratamentos, de certa forma mascarando o efeito gerando resultados “falso negativo”. Percebe-se que animais subdivisão pode variar durante o protocolo, uma vez que animais que eram HI na sessão teste ao decorrer do tempo passa a ser um animal classificado como LI. Parece que há uma relação entre a dose e subdivisão destes animais, sendo que a medida que a dose aumenta mais animais passam a ser classificados como LI.

Tabela 9: Tempo de imobilidade dos animais nos grupos LI e HI na sessão teste do TNF-r: número e porcentagem de animais em cada sub grupo.

		LI	HI
		168,05±7,41 (n=92)	282,45±2,25 (n=91)
Dose			
1mg	CTRL	183,62±8,13 (n=3)	274,5±9,41 (n=5)
	BUP	250,89±2,05 (n=2)	287,66±8,37 (n=6)
	BS	227,23±20,74 (n=3)	276,79±6 (n=3)
	DESI	180,98±19,31(n=4)	270,61±2,89 (n=4)
	FLX	250,89±1,94 (n=3)	307,5±18,01 (n=4)
	Todos	N= 15 (40,5%)	N=22 (59,4%)
3mg	CTRL	183,90±28,52 (n=3)	302,9 ±10,90 (n=5)
	BUP	184,65±60,63 (n=3)	295,43±11,89 (n=5)
	BS	222,86±0 (n=1)	294,18±7,08 (n=7)
	DESI	212,45±24,87 (n=4)	290,66±6,94 (n=4)
	FLX	153,44±0(n=1)	291,29±7,99 (n=7)
	Todos	N= 12 (30%)	N= 28 (70%)
10mg	CTRL	242,837±6,43 (n=4)	277,54±3,36 (n=4)
	BUP	108,95±34,93 (n=5) *	264,06±1,54 (n=3) #
	BS	100,26±54,39 (n=4) *	282,42±13,29 (n=4)
	DESI	197,52±18,32 (n=4)	281,68±21,41 (n=4)
	FLX	162,78±23,31 (n=2) *	273,30±6,86 (n=6)
	Todos	N=19 (47,5%)	N=21 (52,5%)
30mg	CTRL	214,53±26 (n=6)	295,62±18,2 (n=2)
	BUP	190,19±18,76 (n=7)	266,53±0 (n=1)
	BS	171,04±24,71 (n=7)	274,64±0 (n=1)
	FLX	238,15± 8,88(n=3)	275,49±11,08 (n=5)
	Todos	N=23 (71,8%)	N=9 (28,12%)

Dados expressos em média ± EPM. n=número de animais por grupo ou subgrupo. Estão incluídos todos os animais de todos os experimentos. *p<0,05 em relação ao grupo controle LI; # p<0,05 em relação ao grupo controle HI. BS= butirato de sódio, BUP= bupropiona, DES= desipramina, FLX=fluoxetina.

Tabela 10: Tempo de imobilidade dos animais nos grupos LI e HI na sessão reteste 1 do TNF-r número e porcentagem de animais em cada sub grupo.

		LI	HI
		230,45±8,63 (n=76)	328,13±1,42 (n=77)
Dose			
1mg	CTRL	0±0 (n=0)	325,54±3,88 (n=8)
	BUP	283,07±8,26 (n=5)	328,94±12,27 (n=3)
	BS	282,14±0,63 (n=3)	334,52±6,4 (n=4)
	DESI	298,36±7,22(n=2)	336,89±3,41 (n=6)
	FLX	301,05±0 (n=1)	332,48±7,34 (n=4)
	Todos	N=11 (30,55%)	N=25 (69,44%)
3mg	CTRL	287,28±8,02 (n=3)	331,19 ±4,09 (n=5)
	BUP	153,74±0 (n=1)	326,93±3,77 (n=7)
	BS	295,42±0,92 (n=2)	318,89±4 (n=6)
	DESI	256,50±18,62 (n=5)	334,43±2,11 (n=3)
	FLX	221,19±69,26(n=2)	328,09±7,69 (n=6)
	Todos	N=13 (32,5%)	N=27 (67,5%)
10mg	CTRL	248,2±20,83 (n=6)	311,39±0,14 (n=2)
	BUP	205,48±29,78 (n=6)	324,02±2,04 (n=2) #
	BS	107,41±32,23 (n=6) *	329,45±0,91 (n=2) #
	DESI	220,74±42,66 (n=7)	305,36±0 (n=1)
	FLX	229,71±31,24 (n=7)	341,31±0(n=1) #
	Todos	N=32 (80%)	N=8 (20%)
30mg	CTRL	194,53±48,88 (n=4)	338,26±3,90 (n=4)
	BUP	173,24±74,02 (n=3)	317,38±2,46(n=5) #
	BS	233,53±24,56 (n=5)	336,73±1,60 (n=3)
	FLX	283,06±6,64(n=5)	322,32±3,99 (n=3) #
	Todos	N=17 (53,12%)	N=15 (46,98%)

Dados expressos em média ± EPM. n=número de animais por grupo ou subgrupo. Estão incluídos todos os animais de todos os experimentos. *p<0,05 em relação ao grupo controle LI; # p<0,05 em relação ao grupo controle HI. BS= butirato de sódio, BUP= bupropiona, DES= desipramina, FLX=fluoxetina.

Tabela 11: Tempo de imobilidade dos animais nos grupos LI e HI na sessão reteste 2 do TNF-r número e porcentagem de animais em cada sub grupo.

		LI	HI
		275,28±6,65 (n=76)	338,20±1,03 (n=77)
Dose			
1mg	CTRL	287,52±22,08 (n=3)	338,31±2,70 (n=5)
	BUP	298,31±20,14 (n=5)	338,98±5,73 (n=3)
	BS	284,04±35,32 (n=2)	333,52±4,29 (n=4)
	DESI	0±0 (n=0)	342,79±3 (n=8)
	FLX	321,211±0 (n=1)	342,12±6,02 (n=6)
	Todos	N=11 (30,55%)	N=25 (69,44%)
3mg	CTRL	261,12±31,76 (n=5)	339,73 ±8,28 (n=3)
	BUP	281,42±33,37 (n=3)	335,87±5,34 (n=5)
	BS	0±0 (n=0)	335,98±3,05 (n=8)
	DESI	310,78±4,18 (n=2)	341,29±4,29 (n=6)
	FLX	242,73±74,12(n=3)	337,53±5,34 (n=5)
	Todos	N=13 (32,5%)	N=27 (67,5%)
10mg	CTRL	288,85±10,43 (n=4)	338,39±5,48 (n=4)
	BUP	258,42±13,43 (n=4)	342,74±2,70 (n=4)
	BS	236,26±41,55 (n=6)	330,66±6,82 (n=2)
	DESI	274,19±15,56 (n=7)	333,93±0 (n=1)
	FLX	312,39±2,30 (n=6) *	339,09±1,25(n=2)
	Todos	N=27 (67,5%)	N=13 (32,5%)
30mg	CTRL	298,98±13,16 (n=4)	338,6±5,80 (n=4)
	BUP	263,58±31,40 (n=7)	326,69±0(n=1)
	BS	254,31±24,60 (n=7)	330,49±0 (n=1)
	FLX	289,47±9,87(n=5)	337,11±4,74 (n=3)
	Todos	N=23 (71,8%)	N=9 (28,12%)

Dados expressos em média ± EPM. n=número de animais por grupo ou subgrupo. Estão incluídos todos os animais de todos os experimentos. *p<0,05 em relação ao grupo controle LI. BS= butirato de sódio, BUP= bupropiona, DES= desipramina, FLX=fluoxetina

Apesar da linhagem de camundongos suíços machos ser muito utilizada na literatura (Bourin *et al.*, 1998; Andreatini e Bacellar, 2000; Prica *et al.*, 2008; Jesse *et al.*, 2010; Colla *et al.*, 2014; Lenzi *et al.*, 2015), inclusive em experimentos de nosso grupo de pesquisa (Silva *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013), existem relatos indicando que suas

características biológicas podem variar de acordo com o fornecedor, inclusive de lote para lote de animais. Bourin *et al.* (2005) diz que animais de mesma linhagem e procedência ao serem testados no teste de Porsolt tiveram tempos de imobilidade diferentes, mesmo sem ter recebido nenhum tratamento, mas que ao compararmos entre linhagens, o suíço, por ter melhor resposta aos antidepressivos, continua sendo a melhor escolha para o teste de Porsolt, que por sua vez, é a ferramenta mais poderosa para a investigação de novos fármacos e alvos.

Nossos dados não permitem identificar os mecanismos neurobiológicos subjacentes a ausência de efeito, ou efeitos paradoxais, dos fármacos antidepressivos utilizados em nossos experimentos. Porém alguns dados da literatura podem nos permitir algumas especulações. Por exemplo, a ausência de efeitos da FLX, assim como o paradoxo da dose de 30mg/Kg, poderia estar relacionado com a diminuição dos receptores do tipo 5-HT_{2B}, por exemplo (Diaz *et al.*, 2015). Em animais Knock-out para os receptores 5-HT_{2B} a diminuição ou ineficiência destes receptores pode estar relacionada com a resistência aos inibidores seletivos de recaptação de serotonina tornando-os pouco eficazes (Diaz *et al.*, 2015). Cryan *et al.* (2001) observaram que em camundongos que não produziam Norepinefrina e epinefrina a partir da inativação da dopamina- β -hidroxilase não eram responsivos aos tratamentos tanto com DESI quanto BUP. Para o BS, em virtude da baixa quantidade de publicações não temos como supor o que poderia ter influenciado estes comportamentos,

6.4 O teste do nado forçado repetido em camundongos suíços machos: muitos resultados negativos, poucos resultados positivos e uma revisão da literatura.

A partir dos resultados encontrados com um grande número de resultados negativos e alguns poucos positivos, surgiu a dúvida: Quantos resultados negativos similares aos nossos encontram-se na literatura? A partir de nossa revisão sistemática, a resposta é nenhum. Analisando as 321 publicações que se encaixavam nas palavras chave, apenas 8 se encaixaram em todos os critérios de inclusão sendo que um deles se repetia em todas as drogas analisadas (Pandey et al., 2008). As exclusões devido a linhagem do animal e a via de administração foram as mais comuns. A via de administração aparentemente mais utilizada é

a I.P enquanto a linhagem varia bastante, desde animais outbred até animais knock-out para infinitas possibilidades. O sexo e a idade foram também, em menor número, causa de exclusão. Sexo foi razão de exclusão principalmente nos trabalhos mais recentes talvez em decorrência do crescente uso de fêmeas a partir da orientação do FDA e do NIH estabelecendo a necessidade de inclusão de ambos os sexos em pesquisa com animais (Su *et al.*, 2013; Clayton *et al.*, 2014).

A falta de resultados negativos na literatura e o baixo número de publicações com os termos para inclusão em nossa revisão sistemática, nos deixa em dúvida com relação ao grau de fidedignidade e robustez dos resultados encontrados na literatura com camundongos suíços machos. Em outras áreas de pesquisa com animais, existem evidências de que muitos resultados positivos encontrados na literatura são “inflados” (i.e. aparentemente grandes) porque os dados negativos são menos publicados (Sena *et al.*, 2010). Este fenômeno é denominado viés de publicação (publication bias) e parece estar presente em várias áreas literatura biomédica (Sena *et al.*, 2010; Ter Riet *et al.*, 2012; Tsilidis *et al.*, 2013; Sena *et al.*, 2014). O viés de publicação pode reduzir a reprodutibilidade dos estudos (Collins e Tabak, 2014) e pode ter contribuído para o aparecimento dos resultados negativos do presente estudo. Nosso laboratório iniciou estudos de meta-análise para determinar se realmente há evidência de viés de publicação na área do TNF.

6.5 Problemas, soluções e futuros direcionamentos

Um trabalho da Open Science (2015) sugere que as pesquisas de qualidade exemplar devem evitar erros aleatórios ou sistemáticos produzindo resultados empíricos reproduzíveis. Nossos resultados podem ter sido afetados pelas mais variadas razões: Característica dos camundongos suíços fornecidos pela UFSC? A via de administração dos fármacos? O veículo utilizado? O experimentador? A análise estatística? Viés de publicação? Entre outras imensuráveis possibilidades.

A linhagem poderia ser um fator contribuinte para estes resultados por muitas vezes serem variáveis dentro do mesmo do mesmo grupo de pesquisadores. Em um trabalho de Bourin *et al.* (1998) animais que receberam tratamento com Imipramina na dose de 16mg/kg apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade se

comparado ao grupo controle. No entanto em um trabalho de David *et al.* (2003) pertencente ao mesmo grupo de pesquisadores e realizado no mesmo local utilizando a mesma linhagem, a mesma dose, em animais de idade semelhante, a Imipramina não foi efetiva e ainda aumentou o tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle. Vários autores têm relatado também diferenças intra-linhagens nas respostas comportamentais no TNF, tanto no desempenho da linha de base quanto nos tratamentos com antidepressivos (Alcaro *et al.*, 2002). Os nossos grupos controles são muito similares entre si com diferenças mínimas entre os tempos de duração do teste, com algumas exceções nas repetições o que demonstra que a reprodutibilidade do teste em seu controle parece estar sendo alcançada. Para a continuação deste trabalho a realização deste mesmo protocolo com animais de mesma linhagem, mas de outra fonte já está planejado. Além disso, seria interessante utilizar os animais LI para fazer os próximos experimentos e para isto seria necessário fazer uma pré-seleção.

Outra questão levantada seria em relação ao experimentador e o ambiente em que os animais ficaram alojados e passaram pelos testes. Um estudo demonstra que as diferenças de investigadores e fatores ambientais imprevisíveis, de laboratório para laboratório, podem alterar os resultados comportamentais, que por sua vez são fenômenos complexos que são fortemente afetados pela genética e ambiente e ilustram que as técnicas de análise comportamental ainda estão evoluindo (Picciotto e Self, 1999). Em outro trabalho realizado em três diferentes laboratórios em diferentes localizações, utilizando a mesma linhagem de animais, descendentes das mesmas sepas, com as mesmas condições de ciclo de luz, e com exatamente a mesma idade, dependendo do local de teste os animais se comportaram diferentemente mesmo sendo geneticamente idênticos (Enserink, 1999). Além da realização do teste em animais de outra fonte, planejamos um experimento com as possíveis e disponíveis linhagens as quais temos acesso e se possível em laboratórios diferentes do nosso. Seria também interessante separar um bom número de camundongos HI e LI para investigar a neurobiologia envolvida em suas diferentes respostas aos antidepressivos.

7. CONCLUSÃO

Os camundongos suíços machos responderam ao TNF-r com aumento do tempo de imobilidade e redução do tempo de nado de forma semelhante aos ratos Wistar machos (Possamai et al., 2015).

Diferente da imobilidade dos ratos Wistar machos (Possamai et al., 2015), a imobilidade dos camundongos suíços machos no TNF-r não foi afetada pelo tratamento agudo ou crônico com nenhuma dose de FLX indicando que estes animais são pouco sensíveis ao tratamento com os inibidores da recaptação de serotonina.

A imobilidade dos camundongos suíços machos no TNF-r não foi afetada pelo tratamento agudo ou crônico com nenhuma dose de DESI indicando que estes animais são pouco sensíveis ao tratamento com os inibidores da recaptação de noradrenalina.

A imobilidade dos camundongos suíços machos durante a sessão teste do FST-r foi reduzida pelo tratamento agudo com a BUP (10 mg/kg) indicando uma maior sensibilidade destes animais aos inibidores de recaptação de dopamina. Contudo, esta sensibilidade desaparece com o tratamento crônico.

A imobilidade dos camundongos suíços machos foi reduzida pelo BS (10 mg/kg) nos retestes do FST-r indicando que o tratamento crônico é requerido para a efetividade desta dose. Este efeito parece inconsistente ou dose-dependente uma vez que doses de BS menores (1, 3 mg/kg) ou maiores (30 mg/kg) não promoveram redução da imobilidade quando administrados aguda ou cronicamente.

A revisão sistemática realizada para este trabalho mostrou que poucos resultados negativos são publicados com camundongos suíços machos no TNF de forma que não sabemos quais são os verdadeiros resultados esperados para estes animais, neste teste, com os estes fármacos e nestas doses.

Os resultados encontrados a partir da subdivisão em grupos de LI e HI nos mostrou que pode existir uma variação intra-grupo que pode estar mascarando os resultados na análise do grupo. Futuramente pode

ser uma boa ferramenta para maior entendimento da neurobiologia envolvida na resposta de cada grupo.

Os resultados deste trabalho geraram novos questionamentos e mais experimentos buscando o refinamento do TNF- α serão realizados

REFERÊNCIAS

ACHOR, R. W.; HANSON, N. O.; GIFFORD, R. W., JR. Hypertension treated with *Rauwolfia serpentina* (whole root) and with reserpine; controlled study disclosing occasional severe depression. **J Am Med Assoc**, v. 159, n. 9, p. 841-5, Oct 29 1955. ISSN 0002-9955

ALCARO, A. et al. Genotype- and experience-dependent susceptibility to depressive-like responses in the forced-swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 164, n. 2, p. 138-43, Nov 2002. ISSN 0033-3158

ANDREATINI, R.; BACELLAR, L. F. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 549-60, May 2000. ISSN 0278-5846

BELZUNG, C. Innovative drugs to treat depression: did animal models fail to be predictive or did clinical trials fail to detect effects? **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1041-51, Apr 2014. ISSN 1740-634X

BELZUNG, C.; WILLNER, P.; PHILIPPOT, P. Depression: from psychopathology to pathophysiology. **Curr Opin Neurobiol**, v. 30, p. 24-30, Feb 2015. ISSN 1873-6882

BETTIO, L. E. et al. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 7-14, Dec 2014. ISSN 1873-5177

BHATT, S. et al. Neuropharmacological effect of novel 5-HT₃ receptor antagonist, N-n-propyl-3-ethoxyquinoxaline-2-carboxamide (6n) on chronic unpredictable mild stress-induced molecular and cellular response: Behavioural and biochemical evidences. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 5, p. 804-10, Oct 2014. ISSN 1734-1140

BOGDANOVA, O. V. et al. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiol Behav**, v. 118, p. 227-39, Jun 13 2013. ISSN 1873-507X

BORSINI, F. Role of the serotonergic system in the forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 19, n. 3, p. 377-95, Fall 1995. ISSN 0149-7634

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 94, n. 2, p. 147-60, 1988. ISSN 0033-3158

BOURIN, M. et al. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav BrainRes**, v. 164, n. 2, p. 266-9, Nov 7 2005. ISSN 0166-4328

BOURIN, M. et al. Evaluation of efficacies of different classes of antidepressants in the forced swimming test in mice at different ages. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 22, n. 2, p. 343-51, Feb 1998. ISSN 0278-5846

BOURIN, M. et al. Comparison of behavioral effects after single and repeated administrations of four benzodiazepines in three mice behavioral models. **J Psychiatry Neurosci**, v. 17, n. 2, p. 72-7, Jun 1992. ISSN 1180-4882

BOURIN, M. et al. A schematic representation of the psychopharmacological profile of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 20, n. 8, p. 1389-402, Nov 1996. ISSN 0278-5846

BRIELMAIER, J. et al. Chronic desipramine treatment rescues depression-related, social and cognitive deficits in Engrailed-2 knockout mice. **Genes Brain Behav**, v. 13, n. 3, p. 286-298, Mar 2014. ISSN 1601-183X

CASTAGNE, V.; MOSER, P.; PORSOLT, R. D. Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents. In: BUCCAFUSCO, J. J. (Ed.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd. Boca Raton (FL), 2009. (Frontiers in Neuroscience). ISBN 9781420052343.

CLAYTON, J.A., COLLINS, F.S. **NIH to balance sex in cell and animal studies**. *Nature*. 509, 282-283 (2014)

COLLA, A. R. et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 2, p. 720-31, Sep 28 2012. ISSN 1872-7573

COLLA, A. R. et al. Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 108-16, Sep 2014. ISSN 1873-5177

COLLINS, F. S.; TABAK, L. A. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. **Nature**, v. 505, n. 7485, p. 612-3, Jan 30 2014. ISSN 1476-4687

COSTA, A. P. et al. A proposal for refining the forced swim test in Swiss mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45, p. 150-5, Aug 1 2013. ISSN 1878-4216

COVINGTON, H. E., 3RD et al. Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. **J Neurosci**, v. 29, n. 37, p. 11451-60, Sep 16 2009. ISSN 1529-2401

CRAWFORD, A. A. et al. Adverse effects from antidepressant treatment: randomised controlled trial of 601 depressed individuals. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 15, p. 2921-31, Aug 2014. ISSN 1432-2072

CRISPIM JUNIOR, C. F. et al. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Comput Biol Med**, v. 42, n. 2, p. 257-64, Feb 2012. ISSN 1879-0534

CRYAN, J. F. et al. Use of dopamine-beta-hydroxylase-deficient mice to determine the role of norepinephrine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, n. 2, p. 651-7, Aug 2001. ISSN 0022-3565

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 9, p. 775-90, Sep 2005. ISSN 1474-1776

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 547-69, 2005. ISSN 0149-7634

DALVI, A.; LUCKI, I. Murine models of depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 147, n. 1, p. 14-6, Nov 1999. ISSN 0033-3158

DAVID, D. J. et al. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 166, n. 4, p. 373-82, Apr 2003. ISSN 0033-3158

DELGADO, P. L. et al. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by

rapid depletion of plasma tryptophan. **Arch Gen Psychiatry**, v. 47, n. 5, p. 411-8, May 1990. ISSN 0003-990X

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, n. 1, p. 66-72, Sep 1995. ISSN 0033-3158

DHINGRA, D.; CHHILLAR, R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 4, p. 796-807, 2012. ISSN 1734-1140

DHINGRA, D.; VALECHA, R. Punarnavine, an alkaloid isolated from ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. reverses depression-like behaviour in mice subjected to chronic unpredictable mild stress. **Indian J Exp Biol**, v. 52, n. 8, p. 799-807, Aug 2014. ISSN 0019-5189

DIAZ, S. L. et al. Mice lacking the serotonin 5-HT receptor as an animal model of resistance to selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants. **Eur Neuropsychopharmacol**, Dec 11 2015. ISSN 1873-7862

DOMINGUES, Karolina. **Influência do dimorfismo sexual na resposta ao tratamento com Fluoxetina em ratos no nado forçado repetido: contribuição do metabolismo da serotonina**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DULAWA, S. C. et al. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1321-30, Jul 2004. ISSN 0893-133X

ENRIQUEZ-CASTILLO, A. et al. Differential effects of caffeine on the antidepressant-like effect of amitriptyline in female rat subpopulations with low and high immobility in the forced swimming test. **Physiol Behav**, v. 94, n. 3, p. 501-9, Jun 9 2008. ISSN 0031-9384

ENSERINK, M. Behavioral genetics. Fickle mice highlight test problems. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1599-600, Jun 4 1999. ISSN 0036-8075

FAVA, M.; KENDLER, K. S. Major depressive disorder. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 335-41, Nov 2000. ISSN 0896-6273

FERLAND, C. L.; SCHRADER, L. A. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins. **Neuroscience**, v. 174, p. 104-14, Feb 3 2011. ISSN 1873-754

FLORES-SERRANO, A. G. et al. Clinical doses of citalopram or reboxetine differentially modulate passive and active behaviors of female Wistar rats with high or low immobility time in the forced swimming test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 110, p. 89-97, Sep 2013. ISSN1873-5177 >.

GARDIER, A. M.; BOURIN, M. Appropriate use of "knockout" mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 153, n. 3, p. 393-4, Jan 2001. ISSN 0033-3158

GAVIOLI, E. C. et al. Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: new evidence from rats and mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 369, n. 6, p. 547-53, Jun 2004. ISSN 0028-1298

GOLDSTEIN, B. J.; GOODNICK, P. J. Selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of affective disorders--III. Tolerability, safety and pharmacoconomics. **J Psychopharmacol**, v. 12, n. 3 Suppl B, p. S55-87, 1998. ISSN 0269-8811

GUNDERSEN, B. B.; BLENDY, J. A. Effects of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in models of depression and anxiety. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 1, p. 67-74, Jul 2009. ISSN 1873-7064

HAJ-MIRZAIAN, A. et al. Evidence for the involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of nicotine in mouse forced swimming and tail suspension tests. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 19, p. 3551-61, Oct 2015. ISSN 1432-2072

HAMON, M.; BOURGOIN, S. Pharmacological profile of antidepressants: a likely basis for their efficacy and side effects? **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. S625-S632, 2006. ISSN 0924977X.

HAN, A. et al. Possible additional antidepressant-like mechanism of sodium butyrate: targeting the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 292-302, Jun 2014. ISSN 1873-7064

JESSE, C. R.; WILHELM, E. A.; NOGUEIRA, C. W. Depression-like behavior and mechanical allodynia are reduced by bis selenide treatment in mice with chronic constriction injury: a comparison with fluoxetine, amitriptyline, and bupropion. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 212, n. 4, p. 513-22, Dec 2010. ISSN 1432-2072

KALIA, M.; COSTA, E. S. J. Biomarkers of psychiatric diseases: current status and future prospects. **Metabolism**, v. 64, n. 3 Suppl 1, p. S11-5, Mar 2015. ISSN 1532-8600

KARVE, A. V.; JAGTIANI, S. S.; CHITNIS, K. A. Evaluation of effect of allopurinol and febuxostat in behavioral model of depression in mice. **Indian J Pharmacol**, v. 45, n. 3, p. 244-7, May-Jun 2013. ISSN 1998-3751

KHEIRBEK, M. A. et al. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 12, p. 1613-20, Dec 2012. ISSN 1546-1726

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 16 2008. ISSN 1476-4687

LENZI, J. et al. Ferulic acid chronic treatment exerts antidepressant-like effect: role of antioxidant defense system. **Metab Brain Dis**, v. 30, n. 6, p. 1453-63, Dec 2015. ISSN 1573-7365

LEVINSTEIN, M. R.; SAMUELS, B. A. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 208, 2014. ISSN 1662-5153

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DE LIMA, T. C.; DE PADUA CAROBREZ, A. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Behav Brain Res**, v. 158, n. 2, p. 243-50, Mar 30 2005. ISSN 0166-4328

LUCKI, I.; DALVI, A.; MAYORGA, A. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. **Psychopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 315-322, 2001. ISSN 0033-3158/1432-2072.

LUCKI, I.; SINGH, A.; KREISS, D. S. Antidepressant-like behavioral effects of serotonin receptor agonists. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 18, n. 1, p. 85-95, Spring 1994. ISSN 0149-7634

MANOSSO, L. M. et al. Involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant-like effect of zinc in the chronic unpredictable stress model of depression. **J Neural Transm (Vienna)**, Jan 8 2016. ISSN 1435-1463

MEZADRI, T. J. et al. Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **J Neurosci Methods**, v. 195, n. 2, p. 200-5, Feb 15 2011. ISSN 1872-678X

MILLER, B. R.; HEN, R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. **Curr Opin Neurobiol**, v. 30, p. 51-8, Feb 2015. ISSN 1873-6882

MOLENDIJK, M. L.; DE KLOET, E. R. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 62, p. 389-91, Dec 2015. ISSN 1873-3360

NASCIMENTO, F. P. et al. Thalidomide reduces mechanical hyperalgesia and depressive-like behavior induced by peripheral nerve crush in mice. **Neuroscience**, v. 303, p. 51-8, Sep 10 2015. ISSN 1873-7544

NEGUS, S. S.; MILLER, L. L. Intracranial self-stimulation to evaluate abuse potential of drugs. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 3, p. 869-917, Jul 2014. ISSN 1521-0081

NESTLER, E. J. From neurobiology to treatment: progress against addiction. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1076-9, Nov 2002. ISSN 1097-6256

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, Mar 28 2002. ISSN 0896-6273

OH, J. E. et al. Paradoxical anxiogenic response of juvenile mice to fluoxetine. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 10, p. 2197-207, Sep 2009. ISSN 1740-634X

OPEN SCIENCE, C. PSYCHOLOGY. Estimating the reproducibility of psychological science. **Science**, v. 349, n. 6251, p. aac4716, Aug 28 2015. ISSN 1095-9203

PANDEY, D. K. et al. Depressant-like effects of parthenolide in a rodent behavioural antidepressant test battery. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 12, p. 1643-50, Dec 2008. ISSN 0022-3573

PAWAR, G. R. et al. Evaluation of antidepressant like property of amisulpride per se and its comparison with fluoxetine and olanzapine using forced swimming test in albino mice. **Acta Pol Pharm**, v. 66, n. 3, p. 327-31, May-Jun 2009. ISSN 0001-6837

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 177, n. 3, p. 245-55, Jan 2005. ISSN 0033-3158

PICCIOTTO, M. R.; SELF, D. W. Testing the genetics of behavior in mice. **Science**, v. 285, n. 5436, p. 2067; author reply 2069-70, Sep 24 1999. ISSN 0036-8075

POLESZAK, E. et al. The influence of caffeine on the activity of moclobemide, venlafaxine, bupropion and milnacipran in the forced swim test in mice. **Life Sci**, v. 136, p. 13-8, Sep 1 2015. ISSN 1879-0631

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, Oct 1977. ISSN 0003-9780

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. **Eur J Pharmacol**, v. 51, n. 3, p. 291-4, Oct 1 1978. ISSN 0014-2999

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, Apr 21 1977. ISSN 0028-0836

POSSAMAI, F. et al. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 58, p. 15-21, Apr 3 2015. ISSN 1878-4216

POWELL, T. R.; FERNANDES, C.; SCHALKWYK, L. C. Depression-Related Behavioral Tests. **Curr Protoc Mouse Biol**, v. 2, n. 2, p. 119-27, 2012. ISSN 2161-2617

PRICA, C.; HASCOET, M.; BOURIN, M. Is co-administration of bupropion with SSRIs and SNRIs in forced swimming test in mice, predictive of efficacy in resistant depression? **Behav Brain Res**, v. 194, n. 1, p. 92-9, Dec 1 2008. ISSN 0166-4328

REN, L. X. et al. Antidepressant-like effects of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae). **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 11, p. 2304-6, Nov 2006. ISSN 0918-6158

RENERIC, J. P.; LUCKI, I. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 136, n. 2, p. 190-7, Mar 1998. ISSN 0033-3158

REUL, J. M. Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways. **Front Psychiatry**, v. 5, p. 5, 2014. ISSN 1664-0640

RUSSO, S. J.; CHARNEY, D. S. Next generation antidepressants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 12, p. 4441-2, Mar 19 2013. ISSN 1091-6490

SALES, A. J.; JOCA, S. R. Effects of DNA methylation inhibitors and conventional antidepressants on mice behaviour and brain DNA methylation levels. **Acta Neuropsychiatr**, v. 28, n. 1, p. 11-22, Feb 2016. ISSN 1601-5215

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805-9, Aug 8 2003. ISSN 1095-9203

SASHIDHARA, K. V. et al. Designing, synthesis of selective and high-affinity chalcone-benzothiazole hybrids as *Brugia malayi* thymidylate kinase inhibitors: In vitro validation and docking studies. **Eur J Med Chem**, v. 103, p. 418-28, Oct 20 2015. ISSN 1768-3254

SCHEUING, L. et al. Antidepressant mechanism of ketamine: perspective from preclinical studies. **Front Neurosci**, v. 9, p. 249, 2015. ISSN 1662-4548

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, Nov 1965. ISSN 0002-953X

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic amines and emotion. **Science**, v. 156, n. 3771, p. 21-37, Apr 7 1967. ISSN 0036-8075

SCHROEDER, F. A. et al. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 1, p. 55-64, Jul 1 2007. ISSN 0006-3223

SENA, E. S. et al. Systematic reviews and meta-analysis of preclinical studies: why perform them and how to appraise them critically. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 34, n. 5, p. 737-42, May 2014. ISSN 1559-7016

SENA, E. S. et al. Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy. **PLoS Biol**, v. 8, n. 3, p. e1000344, Mar 2010. ISSN 1545-7885

SILVA, C. F. et al. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 1, p. 85-90, Nov 20 2011. ISSN 1872-7549

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. **Behav Brain Res**, v. 222, n. 1, p. 246-64, Sep 12 2011. ISSN 1872-7549

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nat Protoc**, v. 7, n. 6, p. 1009-14, Jun 2012. ISSN 1750-2799

SU, J. et al. A Test-Retest Paradigm of the Forced Swimming Test in Female Mice Is Not Valid for Predicting Antidepressant-Like Activity: Participation of Acetylcholine and Sigma-1 Receptors. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 123, n. 3, p. 246-255, 2013. ISSN 1347-8613

1347-8648.

SULSER, F.; BICKEL, M. H.; BRODIE, B. B. THE ACTION OF DESMETHYLIMIPRAMINE IN COUNTERACTING SEDATION AND CHOLINERGIC EFFECTS OF RESERPINE-LIKE DRUGS. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 144, p. 321 - 330, 1964.

TAKSANDE, B. G. et al. Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 720, n. 1-3, p. 115-20, Nov 15 2013. ISSN 1879-0712

TER RIET, G. et al. Publication bias in laboratory animal research: a survey on magnitude, drivers, consequences and potential solutions. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e43404, 2012. ISSN 1932-6203

TSILIDIS, K. K. et al. Evaluation of excess significance bias in animal studies of neurological diseases. **PLoS Biol**, v. 11, n. 7, p. e1001609, Jul 2013. ISSN 1545-7885

WHISKEY, E.; TAYLOR, D. A review of the adverse effects and safety of noradrenergic antidepressants. **J Psychopharmacol**, v. 27, n. 8, p. 732-9, Aug 2013. ISSN 1461-7285

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 83, n. 1, p. 1-16, 1984. ISSN 0033-

WILLNER, P.; BELZUNG, C. Animal models of depression: an overview. **Pharmacol Ther**, v. 45, n. 3, p. 425-55, 1990. ISSN 0163-7258

WILLNER, P.; BELZUNG, C. Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 19, p. 3473-95, Oct 2015. ISSN 1432-2072

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 10 Pt 1, p. 2331-71, Dec 2013. ISSN 1873-7528

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. Resistance to antidepressant drugs: the case for a more predisposition-based and less hippocampocentric research paradigm. **Behav Pharmacol**, v. 25, n. 5-6, p. 352-71, Sep 2014. ISSN 1473-5849

WILSON, C. A.; KOENIG, J. I. Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 5, p. 759-73, May 2014. ISSN 1873-7862